

Descrição referente à patente de invenção de LifeScan, Inc., norte-americana, industrial e comercial, estabelecida em 2443 Wayandotte Street, Mountain View, CA 94043-2312, Estados Unidos da América, (inventores: Roger Phillips, Geoffery McGarraugh, Franklin A. Jurik e Raymond D. Underwood, residentes nos E.U.A.), para "PROCESSO E DISPOSITIVO PARA A DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE COMPOSTOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS (ANALÍTICOS) EM FLUIDOS AQUOSOS".

DESCRIÇÃO

Ambito da invenção

A presente invenção refere-se a um processo e dispositivo de ensaio para determinação colorimétrica de componentes químicos e bioquímicos (análíticos) em fluidos aquosos especialmente sangue completo. Numa realização preferida refere-se a um processo e dispositivo de ensaio para medir a concentração de glicose no sangue completo por meio de colorimetria.

Antecedentes da invenção

É de uma importância cada vez maior a quanti-

ficação de componentes químicos e bioquímicos em fluidos aquos coloridos, especialmente fluidos biológicos coloridos como o sangue completo e a urina e derivados de fluidos biológicos como o soro sanguíneo e plasma sanguíneo. Existem importantes aplicações no diagnóstico e tratamento médico e na quantificação da exposição a medicamentos terapêuticos, intoxicantes, produtos químicos perigosos e análogos. Por vezes, as quantidades de materiais a ser determinados são ou tão minúsculos — na variação de um micrograma ou menos por decilitro — ou tão difíceis de determinar com precisão que o aparelho utilizado é complicado e útil só para pessoal de laboratório especializado. Neste caso os resultados não estão geralmente disponíveis em algumas horas ou dias após a recolha da amostra. Noutras vezes, há normalmente uma ênfase na aptidão de operadores leigos para realizar o teste de modo rotineiro, rápido e reproduzível fora de um ambiente de laboratório com rápida ou imediata apresentação da informação.

Um ensaio ou análise médica comum é a medição dos níveis de glicose do sangue por diabéticos. Ensinamentos correntes aconselham os doentes diabéticos a medir o seu nível de glicose do sangue desde duas a sete vezes por dia dependendo da gravidade da doença ou dos seus casos individuais. Baseando-se no modelo observado nos níveis de glicose medidos, o doente e o médico juntos fazem ajustes na dieta, exercício e injeção de insulina para controlar melhor a doença. Claro que esta informação deve estar de imediato à disposição do doente.

Actualmente um método largamente utilizado nos Estados Unidos emprega um artigo de ensaio do tipo descrito na Patente Norte Americana nº 3 298 789 emitida em 17 de Janeiro de 1967 a Mast. Neste método coloca-se uma amostra de sangue completo, fresco, (normalmente 20-40 μ l) numa almofada de reagente revestida de etil-celulose que contém um sistema de enzimas possuindo actividade de glicose oxidase e peroxidase. O sistema de enzimas reage com a glicose e liberta peróxido de

hidrogénio. A almofada também contém um indicador que reage com o peróxido de hidrogénio na presença de peroxidase para proporcionar uma cor proporcional em intensidade ao nível de glicose da amostra.

Um outro método de ensaio de glicose do sangue emprega química semelhante mas em vez da almofada revestida de etil-celulose emprega uma película resistente à água através da qual se dispersam as enzimas e o indicador. Este género de sistema está descrito na Patente Norte Americana 3630 957 emitida em 28 de Dezembro de 1971 a Rey et al.

Em ambos os casos deixa-se que a amostra permaneça em contacto com a almofada de reagente durante um determinado tempo (normalmente um minuto). Então, no primeiro caso, lava-se a amostra de sangue com uma corrente de água enquanto no segundo caso se limpa a película. A almofada de reagente ou a película é então seca por enxugamento e avaliada. Faz-se a avaliação quer por comparação da cor obtida com uma tabela de cores ou por colocação da almofada ou película num instrumento de reflectância para leitura de um valor da intensidade da luz.

Embora se tenha utilizado durante anos os métodos referidos anteriormente para controlar a glicose, estes apresentam certas limitações. O tamanho da amostra necessária é bastante grande para um teste de picada de dedo e é difícil de obter para algumas pessoas cujo sangue capilar não se manifeste de imediato.

Além disso, estes métodos partilham uma limitação com outras simples determinações colorimétricas para operadores leigos em que o seu resultado é baseado numa leitura de cor absoluta a qual está por sua vez relacionada com a extensão absoluta da reacção entre a amostra e os reagentes de teste. O facto de a amostra ter de ser lavada ou limpa da almofada de reagente após o intervalo de tempo da reacção exige

ge que o utilizador esteja pronto no fim do intervalo de tempo e limpe ou aplique um fluxo de lavagem na altura devida. O facto de a reacção parar por remoção da amostra conduz a alguma incerteza no resultado, especialmente nas mãos do utilizador doméstico. Uma lavagem excessiva pode apresentar resultados baixos e uma lavagem insuficiente pode apresentar resultados elevados.

Um outro problema que muitas vezes existe em determinações colorimétricas simples para operadores leigos é o da necessidade de se iniciar uma sequência de tempo quando se aplica o sangue a uma almofada de reagente. Um utilizador provocará normalmente uma picada num dedo para obter uma amostra de sangue e necessitará então de, simultaneamente, aplicar o sangue do dedo a uma almofada de reagente enquanto inicia um circuito de tempo com a sua outra mão, necessitando por isso das duas mãos simultaneamente. Isto é particularmente difícil visto que é muitas vezes necessário assegurar-se que o circuito de tempo começou apenas quando se aplicou o sangue à almofada de reagente. Todos os métodos da técnica anterior necessitam de manipulações adicionais ou circulação adicional para se obter este resultado. Assim, é desejável a simplificação desta característica dos instrumentos de leitura por reflectância.

A presença de glóbulos vermelhos ou outros componentes coloridos interfere muitas vezes com as medições destes valores absolutos, exigindo-se assim a exclusão de glóbulos vermelhos nestes dois métodos anteriores como se tem largamente praticado. No dispositivo da Patente Norte Americana nº 3 298 789, uma membrana de etil-celulose impede os glóbulos vermelhos de entrar na almofada de reagente. Do mesmo modo, a película à prova de água da Patente Norte Americana nº 3 630 957 impede os glóbulos vermelhos de entrar na almofada. Em ambos os casos a lavagem ou limpeza também actua na remoção destes glóbulos vermelhos que interferem potencialmente, antes da medição.

Deste modo, permanece a necessidade de um sistema de detecção de analitos em líquidos coloridos, como o sangue, que não necessite da remoção de líquido em excesso de uma tira de reflectância da qual se obtém uma leitura da reflectância

Resumo da invenção

Proporcionam-se novos métodos, composições e dispositivo para testes de diagnóstico que compreendem uma matriz porosa hidrofílica que contém um sistema de produção de sinal e um dispositivo de medição de reflectância que é activado por uma alteração na reflectância da matriz quando o fluido penetra na matriz. O método compreende a adição da amostra, normalmente sangue completo, à matriz que filtra partículas grandes, como glóbulos vermelhos, normalmente com a matriz presente no dispositivo. O sistema de produção de sinal produz um produto que altera posteriormente a reflectância da matriz, cuja alteração pode ser relacionada com a presença de um analito na amostra.

Exemplo do sistema de teste de diagnóstico é a determinação da glicose no sangue completo, em que a determinação se faz sem interferência a partir de sangue e sem um protocolo complicado sujeito a erro.

Breve descrição dos desenhos

A presente invenção pode ser melhor compreendida com referência à descrição pormenorizada que se segue quando lida em conjunto com os desenhos anexos, em que:

A figura 1 é uma vista em perspectiva de uma realização de um dispositivo de ensaio que contém a almofada da reacção à qual se aplica o fluido a ser analizado;

A figura 2 é um diagrama esquemático de um

dispositivo que pode ser utilizado na prática da presente invenção;

A figura 3 é uma vista em perspectiva de uma realização preferida do dispositivo de ensaio da presente invenção colocado dentro de um sistema de medição;

A figura 4 é uma vista planificada ampliada de uma realização preferida do dispositivo de ensaio da presente invenção colocado dentro de um sistema de medição;

A figura 5 é um gráfico que assinala uma correção de segunda ordem para eliminar erros devidos a efeitos da cromatografia durante a utilização da presente invenção;

As figuras 6a e 6b são diagramas de varrimento dos valores de glicose conforme medidos por uma realização preferida da presente invenção (denominado sistema MPX de comprimento de onda simples) graficamente representados em oposição aos valores de glicose da Yellow Springs Instruments (YSI; e

As figuras 7a, 7b, 7c e 7d são diagramas de varrimento de valores de glicose conforme medidos por uma segunda realização preferida da presente invenção (denominada sistema MPX de comprimento de onda dual) graficamente representados em oposição aos valores de glicose da "Yellow Springs Instruments" (YSI).

Descrição pormenorizada da invenção

O elemento reagente

A presente invenção proporciona uma metodologia melhorada rápida e simples que utiliza um dispositivo seguro e fácil de operar para a determinação de analitos como a glicose, envolvendo especificamente um substrato de enzima que resulta na produção de peróxido de hidrogénio como um pro-

duto da enzima. O método inclui a aplicação a uma matriz porosa de um pequeno volume de sangue completo, suficiente para saturar a matriz. Note-se que o presente sistema é susceptível de determinação de níveis de glicose a partir de leituras ópticas de amostras de sangue completo. É desnecessária a separação do plasma do sangue da amostra, e a presente invenção evita a necessidade deste passo. Além disto, este sistema é susceptível de realização de leituras correctas contanto que apenas um pequeno volume sature a matriz da tira de teste. Para além deste limite, a leitura é independente do volume. Ligados à matriz encontram-se um ou mais reagentes de um sistema de produção de sinal, que resulta na produção de um produto resultante numa alteração inicial na quantidade de reflectância da matriz. A matriz encontra-se normalmente presente num dispositivo de medição da reflectância quando se aplica o sangue. A amostra líquida penetra a matriz, resultando numa alteração inicial da reflectância na superfície de medição. Faz-se então a leitura uma ou mais vezes após a alteração inicial da reflectância para referir a alteração posterior da reflectância na superfície de medição ou na matriz como resultado da formação do produto da reacção à quantidade de analito na amostra.

Para medições no sangue, especialmente medições de glicose, utiliza-se normalmente sangue completo como veículo de teste. A matriz contém uma enzima oxidase que produz peróxido de hidrogénio. Também contida na matriz estará uma segunda enzima, especificamente uma peroxidase, e um sistema de corante que produz um produto de absorção de luz conjuntamente com a peroxidase. O produto de absorção de luz altera o sinal de reflectância do sistema da matriz. Com sangue completo, as leituras fazem-se em dois comprimentos de onda diferentes, com a leitura de um comprimento de onda utilizada para separar a interferência de segundo plano causada pelo hematócrito, oxigenação sanguínea, e outras variáveis que podem afectar o resultado. Assim, a presente invenção é susceptível de analisar amostras de sangue completo.

Utiliza-se um elemento reagente que inclui a matriz e os membros do sistema de produção de sinal contidos na matriz. O elemento reagente pode incluir outros componentes para aplicações específicas. O método requer a aplicação de um pequeno volume de sangue, que normalmente não tenha sido sujeito a tratamento anterior (a não ser um tratamento por opção com um anticoagulante), à matriz. O período de tempo da medição é activado ou iniciado pelo dispositivo detectando automaticamente uma alteração na reflectância da matriz quando o fluido penetra na matriz. A alteração na reflectância para além de um período de tempo pré-determinado como resultado da formação do produto da reacção está então relacionada à quantidade de analito da amostra. A intensidade da fonte de luz utilizada para analisar a amostra é, naturalmente, também cuidadosamente controlada e regulada para assegurar a possibilidade de repetição da medição.

O primeiro componente da presente invenção a considerar é um elemento reagente, por conveniência em forma de uma almofada, que inclui uma matriz porosa inerte e o componente ou componentes de um sistema de produção de sinal, cujo sistema é susceptível de reacção com um analito para produzir um produto de reacção de absorção de luz, impregnado nos poros da matriz porosa. O sistema de produção de sinal não impede de modo significativo o fluxo do líquido através da matriz.

A fim de auxiliar a leitura da reflectância, é preferível que a matriz possua pelo menos um lado que seja liso e plano. Normalmente, forma-se a matriz numa folha fina com pelo menos um lado liso e plano. Em utilização, aplica-se a amostra de líquido a ser analisado a um dos lados da folha em que qualquer composto do teste presente passa através do elemento reagente por meio de acções de capilaridade, torcida, fluxo de gravidade ou difusão. Os componentes do sistema de produção de sinal presentes na matriz reagirão para proporcionar um produto de reacção de absorção de luz. A luz incidente

encontra o elemento reagente num local diferente do local ao qual se aplica a amostra. A luz é então reflectida a partir da superfície do elemento como luz reflectida difusa. Esta luz difusa é recebida e medida, por exemplo pelo detector de um espectrofotómetro de reflectância. A quantidade de luz reflectida estará relacionada com a quantidade de analito na amostra, sendo normalmente uma função inversa da quantidade de analito na amostra.

A matriz

Cada um dos componentes necessários para a produção do elemento reagente será descrito em tempo. O primeiro componente é a própria matriz.

A matriz será uma matriz porosa hidrofílica à qual se ligam os reagentes de modo covalente ou não-covalente. A matriz permitirá o fluxo de um veículo aquoso através da matriz. Permitirá também a ligação de composições de proteínas à matriz sem significativamente afectar de modo adverso a actividade biológica da proteína, isto é, a actividade enzimática de uma enzima. Na extensão a que as proteínas têm de ser ligadas de modo covalente, a matriz possuirá locais para a ligação covalente ou pode ser activada por meios conhecidos pela técnica. A composição da matriz deverá ser reflectida e de espessura suficiente para permitir a formação de um corante de absorção de luz no volume não ocupado ou na superfície a fim de afectar de modo substancial a reflectância a partir da matriz. A matriz pode ser de uma composição uniforme ou um revestimento num substrato que proporcione as propriedades físicas e estrutura necessárias.

A matriz não se deformará ao molhar-se, retenendo assim a sua conformação e tamanho originais. A matriz possuirá uma absorção definida, para que o volume que é absorvido possa ser calibrado entre limites razoáveis, sendo as variações normalmente mantidas abaixo de cerca de 50%, de preferência.

rência não superiores a 10%. A matriz possuirá resistência à água suficiente para permitir a manufatura de rotina. A matriz permitirá que os reagentes ligados de modo não-covalente sejam distribuídos de um modo relativamente uniforme na superfície da matriz.

Como exemplos de superfícies de matriz estão as poliamidas, especialmente com amostras que envolvam sangue completo. As poliamidas são polímeros de condensação de monômeros de entre 4 a 8 átomos de carbono, em que os monômeros são lactamas ou combinações de diaminas e ácidos di-carboxílicos. Também podem ser utilizáveis outras composições poliméricas que possuam propriedades comparáveis. As composições de poliamidas podem ser modificadas para introduzir outros grupos funcionais que proporcionem estruturas de carga, para que as superfícies da matriz possam ser neutras, positivas ou negativas, bem como neutras, básicas ou ácidas. As superfícies preferidas são as de carga positiva. Concluiu-se que esta carga positiva aumenta quer a estabilidade quer a durabilidade.

Quando utilizada com sangue total, a matriz porosa possui de preferência poros com um diâmetro médio compreendido entre 0,1 e 2,0 μm , de preferência entre 0,6 e 1,0 μm . Quando a matriz porosa contém poros possuindo um diâmetro médio de 0,8 μm , a amostra de sangue não causará um efeito cromatográfico. Isto significa que a amostra de sangue não procurará sair dos bordos da matriz circular. Pelo contrário, o sangue permanece localizado dentro de todos os poros da matriz e proporciona uma possibilidade de leitura uniforme de toda a matriz. Além disso, este tamanho de poro maximiza o efeito de não-manchamento do sangue. Isto é, o tamanho do poro é simultaneamente cheio de modo adequado, mas não cheio de mais, para que o nível do hematórito de sangue não seja a causa de a amostra necessitar de ser enxuta antes da leitura da amostra. Também se concluiu que os poros deste tamanho são óptimos quando se tem em consideração a durabilidade e a estabilidade.

Um modo preferido de preparação do material poroso é moldar o polímero hidrofílico num núcleo de fibras não tecidas. As fibras do núcleo podem ser de qualquer material fibroso que possuam a integridade e resistência desritas, como os poliésteres e poliamidas. O reagente que formará o produto de reacção de absorção de luz, que será apresentado posteriormente em detalhe, está presente dentro dos poros da matriz mas não obstrui a matriz para que a porção líquida do veículo de teste, por exemplo sangue, ao ser analisado, possa fluir através dos poros da matriz, enquanto que as partículas tais como os eritrócitos, sejam retidas à superfície.

A matriz é reflectiva de modo substancial para que proporcione uma reflectância difusa sem a utilização de um suporte reflectivo. De preferência pelo menos 25%, com maior preferência pelo menos 50%, da luz incidente aplicada à matriz é reflectida e emitida como reflectância difusa. Utiliza-se normalmente uma matriz de espessura inferior a 0,5 mm, sendo preferível com espessura compreendida entre 0,01 mm e 0,3 mm. É ainda de maior preferência uma espessura entre 0,1 mm e 0,2 mm, especificamente para matriz de nylon.

Normalmente, a matriz estará ligada a um suporte a fim de lhe proporcionar forma física e rigidez, embora isto possa não ser necessário. A figura 1 apresenta uma realização da presente invenção em que há uma tira 10 que possui uma fina almofada de matriz hidrofílica 11 colocada numa extremidade de um suporte de plástico ou pega 12 por meio de um adesivo 13 que une de modo firme e directo a almofada de reagente 11 à pega 12. Existe um furo 14 no suporte de plástico 12 no local ao qual está ligada a almofada de reagente 11 para que se possa aplicar a amostra a um dos lados da almofada de reagente e a luz reflectida a partir do outro lado.

Aplica-se uma amostra de líquido a ser testado à almofada 11.

Geralmente, com sangue como exemplar de uma amostra a ser testada, a almofada de reagente será na ordem dos 10 mm^2 a 100 mm^2 de área, especialmente 10 mm^2 a 50 mm^2 de área (ou possuindo um diâmetro de cerca de 2 mm a 10 mm), a qual tem normalmente um volume que ficará mais do que saturado com 5-10 microlitros de amostra. Naturalmente, uma vez atingida a saturação acima dos limites de 5-10 microlitros, não é necessária qualquer outra quantidade de sangue.

Efectuaram-se na técnica anterior medições de reflectância difusa utilizando um suporte reflectivo unido ou colocado atrás da matriz. Tal suporte não é necessário ou estará presente normalmente durante a prática da presente invenção, quer como parte do elemento reagente ou do dispositivo de reflectância.

Como se pode observar na figura 1, o apoio segura a almofada reagente 11 para que se possa aplicar uma amostra a um lado da almofada de reagente 11 enquanto se mede a reflectância da luz a partir do outro lado da almofada de reagente 11 oposto ao local onde se aplica a amostra.

A figura 2 representa um sistema em que o reagente se aplica ao lado com o furo 14 na pega do apoio 12 enquanto a luz é reflectida e medida no outro lado da almofada de reagente 11. Podem empregar-se outras estruturas para além da descrita. A almofada 11 pode apresentar várias formas e formatos, sujeitas às limitações aqui incluídas. A almofada 11 deve ser acessível pelo menos numa superfície e normalmente nas duas.

Pode unir-se a camada hidrofilica (elemento reagente) ao apoio por qualquer meio conveniente, por exemplo, um suporte, agrafe ou adesivos; contudo, no método de preferência é ligado à base. A ligação pode ser feita com qualquer adesivo não-reactivo, por um método térmico em que a superfície de base é suficientemente fundida para prender algum do

material utilizado para a camada hidrofílica ou por métodos de ligação ultra-sónica ou por microondas que unem do mesmo modo as almofadas hidrofílicas da amostra à base. É importante que a ligação seja de tal modo a não interferir de modo substancial com as medições da reflectância difusa ou com a reacção a ser medida, embora seja improvável que isto ocorra pois não é necessário adesivo no local onde é feita a leitura. Por exemplo pode aplicar-se um adesivo 13 à tira de base 12 seguido primeiro por perfuração do furo 14 na tira e adesivo combinados e então aplicar a almofada de reagente 11 ao adesivo próximo do furo 14 para que a porção periférica da almofada de reagente se ligue à tira de base.

Os reagentes químicos

Pode utilizar-se qualquer sistema de produção de sinal que seja susceptível de reagir com o analito da amostra para produzir (quer directa ou indirectamente) um composto que seja characteristicamente absorutivo a um comprimento de onda diferente do comprimento de onda a que o veículo de teste absorve de modo substancial.

As matrizes de poliamida são particularmente úteis para efectuarem reacções em que o substrato (analito) reage com uma enzima oxidase que utiliza oxigénio de tal modo que produz um produto que reage posteriormente com um intermediário de corante para formar directa ou indirectamente um corante que absorve numa variação de comprimento de onda predeterminedada. Por exemplo, uma enzima oxidase pode oxidar um substrato e produzir peróxido de hidrogénio como um produto da reacção. O peróxido de oxigénio pode depois reagir com um intermediário ou precursor de corante, numa reacção por catalise ou não catalise, para produzir uma forma oxidada do intermediário ou precursor. Este material oxidado pode produzir o produto colorido ou reagir com um segundo precursor para formar o corante final.

Exemplos não limitativos de análises e reagentes típicos incluem os seguintes materiais constantes na lista que se segue:

<u>Tipo de amostra e analito</u>	<u>Reagentes</u>
Glicose em sangue, soro, urina ou outros fluidos biológicos, vinho, sumos de frutas ou outros fluidos aquosos coloridos. O sangue completo é um tipo de amostra particularmente preferido, pois a separação é demorada e impraticável com utilização doméstica.	Glicose oxidase, Peroxidase e um aceitador de oxigénio.
	Os aceitadores de oxigénio incluem:
	0-dianizina (1)
	0-toluidina
	0-tolidina (1)
	Benzidina (1)
	2,2'-azinodi-(3-etil-benz-tiazolina ácido sulfônico(6)) (1)
	3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona e N,N-dimetilanilina (1)
	Fenilo e 4-aminofenazona (1)
	2,4-diclorofenol sulfonatado e 4-aminofenazona (2)
	3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona e ácido 3-(dimetilamino)benzóico (3)
	2-metoxi-4-alil fenol (4)
	4-amino-antipireno-dimetilanilina (5)

(1) Conforme descreve Clinical Chemistry, Richterich e Columbo, p. 367 e referências citadas aqui
(2) Analyst, 97, (1972) 142-5.
(3) Anal. Biochem. 105 (1980) 389-397
(4) Anal. Biochem., 79, (1977) 597-601
(5) Clinica Chemica Acta, 75, (1977) 387-391

• Todos aqui incluídos como referência.
•

O Método de Análise

O método de análise para a presente invenção baseia-se numa alteração da absorção, conforme medida por reflectância difusa, a qual está dependente da quantidade de analito presente na amostra a ser testada. Esta alteração pode ser determinada por medição da alteração na absorção da amostra de teste entre dois ou mais pontos em tempo.

O primeiro passo do ensaio a ser considerado será a aplicação da amostra à matriz. Na prática, pode realizar-se uma análise do seguinte modo:

Primeiro obtém-se uma amostra de fluido aquoso que contenha um analito. Pode obter-se sangue por picada no dedo, por exemplo. Aplica-se um excesso deste fluido, para além dos limites de saturação da matriz na área onde a reflectância vai ser medida. (i.e., cerca de 5-10 microlitros) ao elemento ou elementos reagentes do dispositivo de teste. Não é necessário o simultâneo arranque de um cronômetro (como é vulgarmente necessário na técnica anterior), conforme se tornará claro mais adiante, devido ao processo de iniciação praticado pela presente invenção. Pode retirar-se o excesso de fluido, como enxugar à luz, mas tal remoção também não é necessária. O dispositivo de teste é normalmente montado num instrumento para leitura da absorção da luz, por exemplo, intensidade da cor por reflectância, antes da aplicação da amostra. Mede-se a absorção em certos pontos em tempo após a aplicação da amostra. A absorção diz respeito nesta aplicação não só à luz dentro do limite visual co comprimento de onda mas também fora do limite visual do comprimento de onda, tais como a radiação infravermelha ou ultravioleta. A partir destas medições de absorção pode calibrar-se a velocidade de desenvolvimento da cor em termos de nível do analito.

O Instrumento de Medição

Pode conseguir-se um instrumento apropriado,

como um espectrofotômetro de reflexão difusa com "software" apropriado, para ler automaticamente a reflexão em certos pontos em tempo, calcular a velocidade de alteração da reflectância e, utilizando factores de calibragem, controlar o nível do analito no fluido aquoso. Tal dispositivo está esquematicamente representado na figura 2 em que se apresenta um dispositivo de teste da presente invenção compreendendo a base 12 à qual está fixa a almofada do reagente 11. A fonte de luz 5, por exemplo um diodo de emissão de luz de alta intensidade (LED) projecta um feixe de luz para a almofada de reagente. Uma porção substancial desta luz (pelo menos 25%, de preferência pelo menos 35%, e com maior preferência pelo menos 50%, na ausência do produto da reacção) é reflectida de modo difuso a partir da almofada de reagente e é detectada pelo detector de luz 6, por exemplo um fototransistor que produz uma corrente de saída proporcional à luz que recebe.

Se se desejar a fonte de luz 5 e/ou o detector 6 podem ser adaptados a gerar ou responder a uma luz de comprimento de onda específico. O produto de saída do detector 6 passa para o amplificador 7, por exemplo, um circuito integrado linear que converte a corrente do fototransistor em voltagem. O produto do amplificador 7 pode ser distribuído para o circuito de rastreio e detecção 8. Este é um circuito integrado de combinação linear/digital que localiza ou segue a voltagem analógica a partir do amplificador 7 e, sob comando do microprocessador 20, bloqueia ou mantém a voltagem ao seu nível nesse período.

O conversor analógico/digital 19 recebe a voltagem analógica do circuito de rastreio e detecção 8 e converte-o, por exemplo, num número digital binário de doze bits sob comando do microprocessador 20. O microprocessador 20 pode ser um circuito integrado binário. Serve as seguintes funções de controle: 1) regulação de tempo para todo o sistema; 2) leitura do produto de saída do conversor analógico/digital 19; 3) junto com o programa e a memória de dados 21, armazena

mento dos dados que correspondem à reflectância medida em determinados intervalos de tempo; 4) cálculo dos níveis de analito a partir das reflectâncias armazenadas; e 5) produção da saída dos dados de concentração do analito para o mostrador 22. A memória 22 pode ser um circuito integrado digital que armazena os dados e o programa de operação do microprocessador. O referido dispositivo 22 pode apresentar várias formas. Normalmente é um mostrador visual, como um mostrador de cristais líquidos (LCD) ou de LED, mas também pode ser uma impressora de fita, um sinal audível, ou análogo. O instrumento também pode incluir um interruptor de arranque/paragem e pode proporcionar um controle de tempo visível ou audível para indicar tempos para aplicação das amostras, efectuar leituras, etc., se se desejar.

Ligaçāo da Reflectāncia

Na presente invenção, o próprio circuito de reflectância pode ser utilizado para iniciar a regulação de tempo por medição de uma gota em reflectância que ocorre quando a porção aquosa da solução de suspensão aplicada à almofada de reagente (por exemplo, sangue) migra para a superfície na qual a reflectância vai ser medida. Normalmente, o dispositivo de medição é ligado para um modo "Ready" no qual as leituras da reflectância são automaticamente feitas em intervalos de espaços muito próximos (normalmente cerca de 0,2 segundos) a partir de uma tira de reagente não-reactivado, substancialmente seca, diferente da cor branca. A medição inicial é normalmente feita antes da penetração da matriz pelo fluido a ser analisado mas pode ser feita após se ter aplicado o fluido num local sobre o elemento reagente diferente do local onde a reflectância está a ser medida. O valor da reflectância é avaliado pelo microprocessador, normalmente por armazenamento de valores sucessivos em memória e depois por comparação de cada valor com o valor não-reactivado. Quando a solução aquosa penetra a matriz de reagente, a gota em reflectância assinala o começo do intervalo de tempo de medição. Podem uti

lizar-se gotas em reflectância de 5-50% para iniciar a regulação de tempo, normalmente uma gota de cerca de 10%. Neste modo simples há uma sincronização exacta do veículo de teste que alcança a superfície a partir da qual se fazem as medições e a iniciação da sequência de leituras, sem necessidade de actividade pelo utilizador.

Embora todos os sistemas descritos nesta aplicação sejam especialmente dirigidos à utilização de matrizes de poliamida e muito particularmente à utilização de tais matrizes na determinação da concentração de vários açúcares, como a glicose, e outros materiais de origem biológica, não é necessário limitar a característica de ligação da reflectância da presente invenção a tais matrizes. Por exemplo, a matriz utilizada com a ligação da reflectância pode ser formada a partir de qualquer material hidrofílico insolúvel na água e qualquer outro tipo de teste de reflectância.

Aplicação Específica ao Teste da Glicose

Apresentar-se-á agora um exemplo específico relacionado com a detecção da glicose na presença de glóbulos vermelhos a fim de se salientar a vantagem específica e detalhe maior. Embora esta represente a realização preferida da presente invenção, a invenção não se limita à detecção de glicose no sangue.

A utilização de superfícies de poliamida para formar o elemento reagente proporciona inúmeras características desejáveis na presente invenção. Estas incluem: o elemento reagente é hidrofílico (i. e. absorve o reagente e a amostra de imediato), não deforma ao ser molhado (de modo a proporcionar uma superfície plana para leitura da reflectância), é compatível com enzimas (a fim de proporcionar boa estabilidade na duração), absorve um volume de amostra limitado por unidade de volume da membrana (necessária para demonstrar uma extensa variação dinâmica de medições), e apresenta resistência

cia suficiente à água para permitir o fabrico de rotina.

Numa configuração característica, realiza-se o presente método utilizando um dispositivo que consiste num suporte de plástico e do elemento reagente (tendo a matriz imregnado em si o sistema de produção de sinal). A matriz preferida para utilização na preparação do elemento reagente é uma membrana de nylon de microfiltração, particularmente membranas feitas de nylon-66 moldado num núcleo de fibras de poliéster não-tecidas. Numerosas membranas de nylon de microfiltração deste tipo são comercialmente produzidas pela Pall Ultrafine Filtration Corporation, possuindo tamanhos de poros compreendidos entre 0,1 e 3,0 micra. Estes materiais apresentam resistência mecânica e flexibilidade, estabilidade dimensional após exposição à água e humedecimento rápido.

São possíveis muitas variações na estrutura química específica do nylon. Estas incluem nylon-66 não-trabalhado com grupos terminais de carga (vendido sob a marca Registada ULTRAPORE da Pall Ultrafine Filtration Corporation, "Pall"). As cargas positivas predominam abaixo do pH 6 enquanto as cargas negativas predominam acima do pH 6. Noutras membranas o nylon é trabalhado antes de se formar a membrana para proporcionar membranas com propriedades diferentes. Os nylons trabalhados com grupos carboxi são negativamente carregados numa ampla variação de pH (vendidos como CARBOXYDYNE pela Pall). Os nylons podem também ser trabalhados com uma elevada densidade de grupos de carga positiva sobre a sua superfície, normalmente grupos de aminas quaternárias, para que apresentem pequena variação em carga numa ampla variação de pH (vendidos como POSIDYNE pela Pall). Tais materiais são particularmente adequados para a prática da presente invenção.

Concluiu-se que mantendo o pH da solução abaixo de 4,8 ajudará a estabilizar as enzimas na solução. Encontrou-se o nível de estabilidade mais eficiente em pH 4,0. Isto resulta num tempo de armazenamento à temperatura ambiente

de 12-18 meses. Assim, é desejável uma tira de iões de carga positiva.

É também possível utilizar membranas que possuam grupos funcionais reactivos designados por imobilização covalente de proteínas (vendidas como membranas BIODYNE IMMUNO AFFINITY pela Pall). Tais materiais podem ser utilizados para ligar proteínas de modo covalente, por exemplo enzimas, utilizadas como reagentes. Embora todos estes materiais sejam utilizáveis, o nylon possuindo uma elevada densidade de grupos de carga positiva na sua superfície proporcionam a melhor estabilidade dos reagentes quando formulados numa almofada de reagentes seca. Os nylons não-trabalhados proporcionam a seguinte melhor estabilidade com os nylons carboxilados a seguir.

Podem obter-se resultados desejáveis com tamanhos de poros que variam entre 0,2 e 2,0 μm , de preferência entre 0,5 e 1,2 μm , e com maior preferência de cerca de 0,8 μm , quando utilizados com sangue completo.

A forma da pega na qual o elemento reagente é montado é relativamente pouco importante desde que a pega permita o acesso a um lado do elemento reagente pela amostra e ao outro lado do elemento reagente pela luz incidente cuja reflexão vai ser medida. A pega também auxilia na inserção do elemento reagente no dispositivo de medição da absorção para que este registe com o sistema óptico. Um exemplo de uma pega apropriada é uma película de Mylar ou outra tira de plástico à qual se aplicou um adesivo de transferência como os adesivos de transferência 3M 465 ou Y9460. Faz-se um furo no plástico através do adesivo de transferência. Um elemento reagente, normalmente em forma de uma almofada fina, quer contendo reagentes ou à qual se adiciona posteriormente os reagentes, é então aplicado à pega por meio do adesivo de transferência para que fique firmemente unido à pega na área que circunda o furo que foi feito através da pega e do adesivo de transferência.

Este dispositivo está ilustrado na figura 1, que apresenta uma tira 10 que possui uma almofada de reagente 11 ligada a uma pega de película de Mylar 12 por meio do adesivo 13. O furo 14 permite o acesso da amostra ou da luz incidente a um lado da almofada de reagente 11 embora não esteja impedido o acesso ao outro lado da almofada de reagente. Podem escolher-se todas as dimensões da almofada de reagente e da pega de modo a que a almofada de reagente se adapte com segurança num instrumento de leitura de reflectância num local próximo de uma fonte de luz e de um detector de luz reflectida. Geralmente as dimensões do furo variam entre 2-10 mm de diâmetro e as da largura da pega cerca de 15 mm. Um furo 14 de 5 mm de diâmetro na tira de reagente apresentada na figura 1, funciona de modo bastante satisfatório. Naturalmente não há limite específico para o diâmetro mínimo deste furo, embora se prefiram diâmetros de pelo menos 2 mm para facilidade de fabrico, aplicação da amostra e leitura da reflexão da luz.

Conforme se observa ainda nas figuras 3 e 4, a tira 10 pode ser optimamente conduzida numa ranhura 50 de uma máquina de exploração de imagem 60. Isto realiza-se por colocação de um encaixe 15 na tira 10 perto do ponto médio da parte superior da tira 10. Feito isto, a tira 10, quando conduzida através dos lados 55 da ranhura 50, alcançará de modo repetitivo o mesmo local, para assegurar a elevada exactidão nos resultados do teste. Tal carácter repetitivo é assegurado ao movimentar o encaixe 15 contra o pino 65. A tira 10 girará à volta do pino 65 no encaixe 15 para que os bordos 16 da tira se adaptem nos lados 55 da ranhura 50. Isto, certamente, também alinha de modo repetitivo o furo 14 por cima do centro do teste 80 que inclui LEDs múltiplos 5 na máquina de exploração de imagem 60. Isto assegura que o furo 14 que contém a amostra de sangue terá uma dosagem uniforme de luz incidente para análise.

Embora se possa utilizar inúmeros corantes como indicadores, a selecção dependerá da natureza da amostra.

É necessário seleccionar um corante que possua uma absorção a um comprimento de onda diferente do comprimento de onda ao qual os glóbulos vermelhos absorvem a luz, com sangue completo como veículo de teste ou outros contaminantes na solução a ser analisada com outros veículos de teste. O par de corantes MBTH-DMAB (cloridrato de 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona e ácido 3-dimetilaminobenzóico), embora sendo anteriormente descritos como apropriados para o desenvolvimento de cor para marcadores de peroxidase em testes imunológicos de enzimas, nunca foram utilizados num reagente para medição da glicose. Este par de corantes proporciona uma maior variação dinâmica e apresenta uma estabilidade enzimática melhorada quando comparados a corantes tradicionais utilizados para medição da glicose, tais como os derivados da benzidina. Esta estabilidade enzimática torna o par de corantes MBTH-DMAB especialmente desejável para assegurar uma durabilidade maior das tiras de teste. Além disso, o par de corantes MBTH-DMAB não é carcinogénico, uma característica da maior parte dos derivados da benzidina. Outro par de corantes que se pode utilizar na medição da glicose é o par AAP-CTA (4-amino-antipireno e ácido cromotrópico). Embora este par não proporcione uma variação dinâmica tão ampla como o MBTH-DMAB, é estável e apropriado para utilização na prática da presente invenção. quando se mede a glicose. De novo, o par de corantes AAP-CTA proporciona uma variação dinâmica alargada e maior estabilidade na actividade enzimática do que os corantes de benzidina mais largamente utilizados.

A utilização do par MBTH-DMAB permite a correção do hematórito e do grau de oxigenação do sangue com um simples factor de correção. Os corantes de benzidina mais normalmente utilizados não permitem tal correção. O corante MBTH-DMAB forma um cromoforo que absorve em aproximadamente 635 nm mas não para uma extensão significante a 700 nm. Permite-se variações ligeiras nas medições de comprimentos de onda. A 700 nm pode medir-se tanto o hematórito como o grau de oxigenação por medição da cor do sangue. Além disso, os diodos

de emissão de luz (LED) estão comercialmente disponíveis para as duas medidas 635 nm e 700 nm, simplificando assim a produção de massa de um dispositivo. Ao utilizar o tamanho de poros da membrana preferido anteriormente descrito e a formulação do reagente, pode corrigir-se o comportamento quer do hematórito quer da oxigenação por medição ao comprimento de onda simples de 700 nm.

Descobriram-se duas condições adicionais para proporcionar uma estabilidade específica e longa durabilidade para uma formulação de glicose oxidase/peroxidase numa matriz de poliamida. O armazenamento é melhorado a um pH compreendido entre 3,8 e 5,0, de preferência entre 3,8 e 4,3, de maior preferência cerca de 4,0. Do mesmo modo, encontrou-se um bom armazenamento e estabilidade não esperada com uma mistura de um sistema de tampão concentrado aos reagentes encontrados na matriz. Concluiu-se que o tampão mais eficaz era um tampão de citrato de 10% em peso, com concentrações eficazes entre 5-15%. Estas são percentagens peso/volume da solução em que os reagentes são aplicados à matriz. Podem-se utilizar outros tampões na mesma base molar. Consegiu-se a maior estabilidade utilizando um pH baixo, de preferência pH 4, um sistema corante de MBTH-DMAB, e uma concentração de enzimas elevada de aproximadamente 500-1000 M/ml de solução de aplicação. Como se indicou anteriormente, estas tiras preparadas utilizando estes parâmetros resultam numa durabilidade de 12 a 18 meses.

Ao preparar o reagente de MBTH-DMAB e o sistema de enzimas que forma o resíduo do sistema de produção de sinal, não é necessário manter volumes e proporções exactas embora os valores sugeridos a seguir apresentem bons resultados. Os reagentes são de imediato absorvidos pela almofada da matriz quando a glicose oxidase está presente numa solução de cerca de 27-54% em volume, a peroxidase está presente numa concentração de cerca de 2,7-5,4 mg/ml, o MBTH está presente numa concentração de cerca de 4-8 mg/ml, e DMAB está presente numa concentração de cerca de 8-16 mg/ml. A proporção do peso

de DMAB-MBTH é de preferência mantida nos limites de 1:1 a 4:1, de preferência de 1,5:1 a 2,5:1 e de maior preferência de cerca de 2:1.

As técnicas básicas de fabrico para o elemento reagente são, uma vez estabelecidas, directas. A própria membrana é forte e estável, especialmente quando se selecciona uma membrana de nylon da realização preferida. Apenas duas soluções são necessárias para aplicação do reagente, e estas soluções são as duas estáveis e formuladas de imediato. A primeira contém geralmente os componentes corantes e a segunda contém geralmente os enzimas. Quando se utiliza o par de corantes HBTH-DMAB, por exemplo, os corantes individuais são dissolvidos num solvente orgânico aquoso, normalmente numa mistura de 1:1 de acetonitrilo e água. A matriz é mergulhada na solução, o líquido em excesso removido por enxugamento, e a matriz é posteriormente seca, normalmente a 50°C-60°C durante 10-20 minutos. A matriz que contém os corantes é então mergulhada numa solução aquosa que contém as enzimas. A formulação típica contém as enzimas da peroxidase e glicose oxidase bem como qualquer tampão, conservante, estabilizador, ou análogo. A matriz é então enxuta para remover o líquido em excesso e seca como anteriormente. Uma formulação tipo para o reagente de glicose é a seguinte:

Banho corante

Mistura-se:

40 mg de MBTH
80 mg de DMAB
5 ml de acetonitrilo, e
5 ml de água

Agita-se até todos os sólidos estarem dissolvidos e verte-se para um prato de vidro ou outra superfície plana. Mergulha-se uma membrana Posidyne (Pall Co.), enxuga-se o líquido em excesso, e seca-se a 56°C durante 15 minutos.

Banho de enzima

Mistura-se:

6 ml de água
10 mg de EDTA, sal de di-sódio,
200 mg de Sigma Poly PepTM, baixa viscosidade
0,668 g de citrato de sódio
0,523 g de ácido cítrico,
2,0 ml de 6% em peso de GAF GantrezTM AN-139 dissolvi-
do em água
30 mg de peroxidase de rabano, 100 unidades/mg, e
3,0 ml de glicose oxidase, 2000 unidades/ml

Agita-se até todos os sólidos estarem dissol-
vidos e deita-se num prato de vidro ou noutra superfície pla-
na. Mergulha-se uma membrana previamente impregnada com coran-
tes, enxuga-se o líquido em excesso, e seca-se a 56°C durante
15 minutos.

O aparelho electrónico utilizado para fazer
as leituras da reflectância contém, no mínimo, uma fonte de
luz, um detector de luz reflectida, um amplificador, um con-
versor analógico/digital, um microprocessador com memória e
programa, e um dispositivo mostrador, conforme se observa na
figura 2.

A fonte de luz consiste normalmente num diodo
de emissão de luz (LED). Embora seja possível utilizar uma
fonte de luz policromática e um detector de luz susceptível
de medir a dois comprimentos de onda diferentes, um aparelho
preferido deveria conter duas fontes LED ou um diodo único
susceptível de emitir dois comprimentos de onda de luz distin-
tos. Os LEDs comercialmente disponíveis que produzem compri-
mentos de onda de luz descritos como sendo os preferidos na
presente descrição incluem um Hewlett Packard H1MP-1340 com
uma emissão máxima a 635 nm e um Hewlett Packard QEMT-1045
com uma emissão de banda estreita máxima a 700 nm. Os detecto-
res de luz disponíveis comercialmente incluem um Hammamatsu

5874-18K e um Litronix BPX-65.

Embora sejam possíveis outros métodos de fazer medições, o método que se segue proporcionou os resultados desejados. Fizeram-se leituras por meio do fotodetector em intervalos determinados após se ter iniciado a regulação de tempo. O LED de 635 nm é activado apenas durante um breve período de tempo de medição que começa aproximadamente 20 segundos após o tempo de arranque conforme se indicou pelo sistema de ligação da reflectância anteriormente descrito. Se esta leitura indicar que se encontra presente na amostra um elevado nível de glicose, faz-se uma leitura de 30 segundos e utiliza-se no cálculo final para melhorar a exactidão. Normalmente considera-se que os níveis elevados começam cerca dos 250 mg/dl. O antecedente é corrigido com uma leitura a 700 nm feita cerca de 15 segundos após o início do período de medição. A leitura a partir do fotodetector é integrada no intervalo enquanto o LED apropriado é activado, o que acontece normalmente em menos de um segundo. As leituras de reflectância não-trabalhadas utilizam-se posteriormente para cálculos realizados pelo microprocessador após o sinal ter sido amplificado e convertido num sinal digital. Podem utilizar-se inúmeros microprocessadores para efectuar o cálculo. um microcomputador de teclado único AIM65 fabricado pela Rockwell International mostrou-se satisfatório.

Os presentes métodos e aparelhos permitem um procedimento muito simples com passos operacionais mínimos por parte do utilizador. Em utilização, a tira de reagente 10 está colocada no detector para que o furo 14 na tira 10 registe com a óptica do sistema de detecção. O sistema encaixe 15/pino 65 anteriormente descrito, conforme se observa nas figuras 4 e 5, funciona perfeitamente para obter o referido alinhamento. Uma tampa amovível ou outra cobertura está colocada sobre a óptica e a tira para proteger o conjunto da luz ambiente. Isto faz-se para melhorar a leitura da tira 10. Embora o processo de iniciação possa começar à luz, a luz solar di-

recta ou luz de ambiente de alta intensidade tende a inibir os resultados. A tampa 90 assegura que a luz directa não atinge a tira de reagente 10. A tampa que não necessita de ser impermeável à luz, apenas suficiente para proteger a tira 10 da luz directa.

Inicia-se então a sequência de medições pressionando um botão no aparelho de medição que activa o micro-computador para fazer uma medição da luz reflectida a partir da almofada de reagente não-reactivado, denominada uma leitura R_{seca} . Retira-se então a tampa 90 e aplica-se uma gota de sangue à tira de reagente 10, normalmente enquanto a tira de reagente 10 é registada com a óptica e o dispositivo de leitura. É preferível que a tira de reagente se deixe em registo com a óptica a fim de minimizar o manuseamento. Fecha-se então a tampa 90.

O instrumento é susceptível de perceber a aplicação do sangue ou de outra amostra por um decréscimo na reflectância quando a amostra passa através da matriz e a luz reflectida é medida no lado oposto. O decréscimo na reflectância inicia uma sequência de regulação de tempo que está descrita detalhadamente noutras locais da presente descrição. A tampa 90 deve ser substituída dentro dos 15 segundos de aplicação da amostra, embora este tempo possa variar dependendo do tipo de amostra a ser medida.

Os resultados são normalmente apresentados aproximadamente 30 segundos após a aplicação do sangue quando se vai medir uma amostra de glicose sanguínea, embora seja aceitável uma reacção de 20 segundos para amostras de glicose com uma concentração de glicose inferior a 250 mg/dl. Se se vão medir outras amostras, os tempos adequados para apresentação do resultado podem diferir e podem ser determinados de imediato a partir das características do reagente/amostra seleccionados.

Pode fazer-se uma avaliação exacta específica

do nível de glicose (ou de qualquer outro analito a ser medido) utilizando a corrente de segundo plano, isto é, a corrente do fotodetector ligado com com nenhuma luz reflectida a partir da almofada de reagente, para fazer uma correção de segunda ordem. Foi demonstrado que além de um período de 2-3 meses este valor não se altera para um instrumento específico preparado de acordo com as realizações preferidas da presente descrição, e é possível programar esta leitura de segunda ordem na memória do computador como uma constante.

Contudo, com uma ligeira modificação no procedimento, pode medir-se este valor (ou normalizá-lo) com cada análise para resultados mais exactos. Cada LED é activado antes da colocação da amostra de sangue na tira de reagente 10 mas com a tira de reagente no lugar. Mede-se um valor de reflectância da tira 10, com a tira de reagente 10 no lugar e com a tampa de protecção de luz 90 fechada. Se esta medição for diferente da medição original do valor de reflectância, aumenta-se a potência ao LED para que a reflectância seja a mesma. Isto assegura que a medição do conteúdo de glicose do sangue está a ser feita com a mesma escala de repetição para cada leitura da glicose do sangue.

A razão para instituir este método é dupla. Primeiro, a intensidade dos diodos emissores de luz varia grandemente de LED para LED, mesmo quando todos os LEDs de medição são novos. Segundo, a eficiência do LED varia com a temperatura e a vida do LED. Com este método, os resultados são repetíveis na mesma escala.

Os dados não trabalhados para calcular um resultado num teste de glicose são uma corrente de segunda ordem referida como reflectância de segunda ordem, R_b , conforme se descreveu anteriormente; Uma leitura da tira de teste não-reactivada, R_{seca} , que é cerca de 95% opaca à luz e se encontra também descrita anteriormente; e uma medição do ponto final. Utilizando as realizações preferidas aqui descritas, o

ponto final não é particularmente estável e deve ser cronometrado com precisão a partir da aplicação de sangue inicial. Contudo, o medidor de acordo com o aqui descrito realiza esta regulação de tempo automaticamente. Para concentrações de glicose abaixo de 250 mg/dl, consegue-se um ponto final apropriado, estável, em 20 segundos, e efectua-se uma reflectância final, R_{20} . Para concentrações de glicose acima dos 450 mg/dl é apropriada uma leitura de reflectância de 30 segundos, R_{30} . Embora o sistema aqui descrito apresente uma boa diferenciação até 800 mg/dl de glicose, a medição é um pouco ruidosa e inexata acima dos 450 mg/dl, embora não tanto que cause problemas significativos. Tempos de reacção mais prolongados proporcionam leituras mais apropriadas para elevados níveis de concentração de glicose.

Uma leitura de reflectância de 700 nm para a medição de comprimento de onda dual é normalmente feita em 15 segundos (R_{15}). Por esta altura o sangue deverá ter saturado por completo a almofada de reagente. Para além de 15 segundos a reacção continua a realizar-se e é sentida, para uma pequena parte, por uma leitura a 700 nm. Por conseguinte, visto que a absorção de corante pelo sinal de 700 nm é uma desvantagem, ignoram-se nos cálculos as leituras para além de 15 segundos.

Utilizam-se os dados não-trabalhados anteriormente referidos para calcular os parâmetros proporcionais à concentração de glicose os quais podem ser mais facilmente visualizados do que as medições de reflectância. Se se desejar, pode utilizar-se uma transformação logarítmica da reflectância análoga à relação entre a absorção e a concentração do analito observadas em espectroscopia de transmissão (Lei de Beer). Uma simplificação das equações de Kubelka-Monk, derivadas especialmente por espectroscopia de reflectância revelaram-se particularmente úteis. Nesta derivação K/S está relacionado com a concentração de analito com K/S definido pela Equação 1

$$K/S-t = (1 - R^*t)^2 / (2 \times R^*t) \quad (1)$$

R^*t é a reflectividade feita num período de ponto final específico, t , e é a fração absorvida do feixe de luz incidente descrita pela Equação 2, em que R_t é a reflectância do ponto final, R_{20} ou R_{30} .

$$R^*t = (R_t - R_b) / (R_{seca} - R_b) \quad (2)$$

R^*t varia entre 0 para luz não reflectida (R_b) e 1 para luz reflectida total (R_{seca}). A utilização da reflectividade nos cálculos simplifica grandemente o modelo de medidor como uma fonte altamente estável e torna desnecessário um circuito de detecção visto que estes componentes são controlados com cada medição de R_{seca} e R_b .

Para uma leitura de comprimento de onda simples, o K/S pode ser calculado a 20 segundos ($K/S-20$) ou 30 segundos ($K/S-30$). As curvas de calibragem que relacionam estes parâmetros às medições de glicose de YSI (Yellow Springs Instruments) podem descrever-se com precisão pela equação polinomial de terceira ordem representada na Equação 3.

$$YSI = a_0 + a_1(K/S) + a_2(K/S)^2 + a_3(K/S)^3 \quad (3)$$

Os coeficientes para estes polinómios estão listados na Tabela 1.

TABELA 1

Coeficientes para ajuste do polinómio de terceira ordem de curvas de calibragem de comprimento de onda simples

	<u>K/S-20</u>	<u>K/S-30</u>
a_0	-55,75	-55,25
a_1	0,1632	0,1334
a_2	$-5,765 \times 10^{-5}$	$-2,241 \times 10^{-5}$
a_3	$2,58 \times 10^{-8}$	$1,20 \times 10^{-8}$

As espécies químicas simples a serem medidas nas realizações preferidas é o corante inaminas MBTH-DMAB e a matriz completa a ser analisada é sangue completo distribuído numa membrana PosidyneTM de $0,8 \mu$. A revista intitulada "Application of Near Infra Red Spectrophotometry to the Nondestructive Analysis of Foods: A Review of Experimental Results", CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 18 (3) 203-30 (1983), descreve a utilização de instrumentos baseados na medição numa diferença de densidade óptica $\Delta OD (\lambda_a - \lambda_b)$ em que $OD\lambda_a$ é a densidade óptica do comprimento de onda correspondente à absorção máxima de um componente a ser determinado e $OD\lambda_b$ é a densidade óptica a um comprimento de onda em que o mesmo componente não absorve de modo significativo.

O algoritmo para a medição de comprimento de onda dual é por necessidade mais complexo do que para a medição do comprimento de onda simples mas é muito mais eficaz. A correcção de primeira ordem aplicada pela leitura a 700 nm é uma substracção simples da cor de segundo plano própria do sangue. A fim de fazer esta correcção pode determinar-se e determinou-se a relação entre a absorção a 635 nm e 700 nm própria da cor do sangue por medição de amostras de sangue com 0 mg/dl de glicose sobre uma ampla variação de cor do sangue. A variação de cor foi estabelecida por variação do hematórito, e observaram-se relações bastante lineares. A partir destas linhas normalizou-se o K/S-15 a 700 nm para dar equivalência ao K/S-30 a 635 nm. Esta relação está referida na Equação 4, em que K/S-15 n é normalizado K/S-15 a 700 nm.

$$K/S-15n = (K/S-15 \times 1,54) - 0,133 \quad (4)$$

Note-se que a equivalência do sinal normalizado de 700 nm e do sinal 635 nm só é verdadeiro para glicose zero. As expressões de que derivaram as curvas de calibragem definem-se pelas Equações 5 e 6.

$$K/S-20/15 = (K/S-20) - (K/S-15n) \quad (5)$$

$$K/S-30/15 = (K/S-30) - (K/S-15n)$$

(6)

Estas curvas ajustam-se melhor por equações de polinómios de quarta ordem semelhantes à Equação 3 a que se adiciona um termo de quarta ordem em K/S. Os coeficientes de ajuste de computador para estas equações estão listadas na Tabela 2.

TABELA 2

Coeficientes para ajuste do polinómio de quarta ordem de curvas de calibragem de comprimento de onda dual

	<u>K/S-20/15</u>	<u>K/S-30/15</u>
a_0	-0,1388	1,099
a_1	0,1064	0,05235
a_2	$6,259 \times 10^{-5}$	$1,229 \times 10^{-4}$
a_3	$-6,12 \times 10^{-8}$	$-5,83 \times 10^{-8}$
a_4	$3,21 \times 10^{-11}$	$1,30 \times 10^{-11}$

Também se efectuou uma correção de segunda ordem para eliminar erros devidos a efeitos da cromatografia. As amostras de hematórito baixo apresentam como característica baixas leituras a 700 nm comparadas com amostras de hematórito mais elevado com a mesma leitura a 635 nm. Quando a razão de $(K/S-30)/(K/S-15)$ é marcada em oposição a K/S-30 sobre uma ampla variação de hematócritos e concentrações de glicose, a linha resultante no gráfico indica a fronteira entre amostras que apresentam efeitos da cromatografia (acima da curva) e os que não apresentam (abaixo da curva). Os K/S-30 para as amostras acima da curva são corrigidos por subida da leitura para corresponderem a um ponto sobre a curva com o mesmo $(K/S-30)/(K/S-15)$, conforme demonstrado pela correção feita na figura 5.

Os factores de correção referidos anteriormente foram estabelecidos para se adaptar um instrumento uni-

co e um número limitado de preparações de reagente. O algoritmo pode ser optimizado para um instrumento individual e um reagente do mesmo modo que está anteriormente descrito.

Em resumo, o sistema da presente invenção minimiza as acções do operador e proporciona inúmeras vantagens sobre os métodos de leitura da reflectância da técnica anterior. Quando comparado com os métodos anteriores para determinação de glicose no sangue, por exemplo, existem várias vantagens evidentes. Primeiro, a quantidade de amostra necessária para saturar a fina almofada de reagente é pequena (normalmente 5-10 microlitro), e é obviamente independente do volume uma vez que o volume inicial de sangue seja fornecido à almofada de reagente. Segundo, o tempo do operador necessário é apenas o suficiente para aplicar a amostra à fina camada hidrofílica e fechar a tampa (normalmente 4-7 segundos). Terceiro, não é necessária a simultânea regulação do tempo do arranque. Quarto, pode utilizar-se sangue completo. O método não exige qualquer separação ou utilização de sangue livre de glóbulos vermelhos e do mesmo modo pode ser utilizado com outras amostras fortemente coloridas. Quinto, por meio de técnicas de normalização e de leitura da reflectância aplicadas na presente invenção, o sistema proporciona leituras seguras, exactas e repetíveis para o tempo de duração do sistema de exploração de imagem.

Várias vantagens menos óbvias surgem como resultado da prática da presente invenção com sangue completo. Normalmente as soluções aquosas (como o sangue) penetram a membrana hidrofílica para proporcionar uma camada de líquido sobre o lado oposto da membrana, uma superfície que não é então adequada para a medição da reflectância. Concluiu-se, contudo, que o sangue, aparentemente devido a interacções dos glóbulos vermelhos e proteínas no sangue com a matriz, molha a matriz de poliamida sem que um excesso de líquido tenha penetrado a matriz porosa para interferir com a leitura da reflectância no lado oposto da matriz. Além disso, seria de es-

perar que as membranas finas utilizadas na presente invenção quando molhadas transmitissem luz e desenvolvessem apenas um sinal fraco para o dispositivo de medição da reflectância. Os ensinamentos anteriores indicavam geralmente que era necessária uma camada reflectiva por detrás da matriz a fim de reflectir luz suficiente. Noutros casos colocava-se uma almofada branca por detrás da almofada de reagente antes da medição da cor. No caso presente, não se exige nem uma camada reflectiva nem uma almofada branca. De facto, a presente invenção é normalmente realizada com uma superfície de absorção de luz atrás do elemento reagente quando se faz incidir uma luz incidente sobre a matriz. Isto consegue-se utilizando uma superfície de absorção de luz atrás do elemento reagente, junto com a medição da reflectância em dois comprimentos de onda. Isto permite medições de reflectância aceitáveis que se obtêm sem remoção do líquido em excesso da matriz, eliminando assim um passo tipicamente exigido pelos ensinamentos anteriores.

A presente invenção que se encontra agora descrita na generalidade será melhor percebida por referência aos exemplos específicos que se seguem, que se apresentam com a finalidade de apenas ilustrar a presente invenção e não para serem considerados limitadores da invenção a não ser que assim seja especificado.

EXEMPLO 1

Reprodutibilidade

Utilizou-se uma amostra de sangue de homem (possuindo um nível de hematórito de 45) para recolher os dados de reprodutibilidade utilizando a realização presentemente preferida do sistema, denominado sistema MPX. Os resultados estão representados nas tabelas 3-5.

TABELA 3

Reprodutibilidade de um sistema de comprimento de onda simples

YSI(mg/dl)	Média (mg/dl)		D.P. (mg/dl)		%C.V.	
	20seg.	30seg.	20seg.	30seg.	20seg.	30seg.
25	23,1	23,0	2,1	2,04	9,1	9,0
55	53,3	53,2	3,19	3,32	6,0	6,3
101	101	101	3,0	3,3	3,0	3,0
326	326,6	327	13,3	9,8	4,1	3,0
501		503		17,1		3,4
690		675		28		4,15
810		813		37		4,5

* D.P. = Desvio padrão

** % C.V. = Co-variação (medida em percentagem)

*** YSI = Leitura da glicose em Yellow Spring Instrument

TABELA 4

Reprodutibilidade de um sistema de comprimento de onda dual

YSI(mg/dl)	Média (mg/dl)		D.P. (mg/dl)		% C.V.	
	20seg.	30seg.	20seg.	30seg.	20seg.	30seg.
25	25	27	1,34	1,55	5,4	5,7
55	55	57,4	2,58	2,62	4,7	4,6
101	101	101,5	2,55	2,18	2,5	2,1
326	332	330	15,0	7,1	4,5	2,1
501		505		21,3		4,2
690		687		22,8		3,3
810		817		30,4		3,7

TABELA 5

Reprodutibilidade de uma abertura de diâmetro de 3,0 mm

YSI (mg/dl)	% C. V.	
	4,7 mm	3,0 mm
55-100	4,8	4,9
300	3,0	5,0
600	3,8	5,5
avg.	3,9	5,1

Dividiu-se o sangue em aliquotas e reforçou-se com glicose com limites compreendidos entre 25-800 mg/dl. Fizeram-se vinte determinações em cada nível de teste de glicose a partir de tiras tiradas aleatoriamente de uma amostra de 500 tiras (Lote FJ4-49B). Os resultados deste estudo conduziram às seguintes conclusões:

1. Comprimento de onda dual vs. simples: A covariação média para o resultado da dual de 30 segundos foi de 3,7% vs. 4,8% para o resultado do comprimento de onda simples de 30 segundos, um aperfeiçoamento de 23% para os limites de glicose de 25-810 mg/dl. Houve um aperfeiçoamento de 33% na covariação dos limites de glicose de 25-326 mg/dl. Aqui a covariação diminui de 5,4% para 3,6%, um aperfeiçoamento significativo nos limites mais utilizados. A medição do comprimento de onda dual de 20 segundos proporcionaram aperfeiçoamentos na covariação comparada à medição do comprimento de onda simples nos limites de 25-326 mg/dl (Tabelas 3 e 4)
2. Comprimento de onda dual, resultado de 20 vs. 30 segundos: A covariação média para um resultado de 20 segundos nos limites entre 25-100 mg/dl é quase idêntica à leitura de 30 segundos, 4,2% vs. 4,1%. Contudo, a 326 mg/dl, a leitura de 30 segundos tem uma covariação de 2,1% e o resultado de 20 segundos uma covariação de 4,5%. Como se observou na curva de resposta K/S-20, a inclinação começa a diminuir precisamente acima de 250 mg/dl. Isto conduz a fraca reproduzibilidade em níveis de glicose superiores a 300 para o resultado de 20 segundos. A partir destes dados de reprodu-

tibilidade a separação para o resultado de 20 segundos está algures entre 100 e 326 mg/dl. Mais tarde determinou-se uma separação a 250 mg/dl a partir dos resultados do estudo de recuperação desenvolvido no Exemplo II.

3. Dimensão da abertura: Efectuaram-se pesquisas com uma dimensão mais pequena de abertura da óptica, 3,0 mm. A experiência inicial utilizando uma amostra de disco manualmente humedecida em 10 repetições mostraram covariações aperfeiçoadas com uma abertura de 3,0 mm, aparentemente devido a registo mais fácil com a óptica do sistema. Contudo, quando se utilizou a membrana cilíndrica feita à máquina, a média (Tabela 5) da maior abertura, 4,7 mm, foi 3,9% vs. uma covariação média, para a abertura de 3,0 mm, de 5,1%. Este aumento de 30% deveu-se provavelmente à superfície irregular do lote de membranas circulares conforme referido mais adiante.

EXEMPLO II

Recuperação:

Testou-se sangue de 36 dadores para comparação do presente método preferido denominado MPX com um método característico da técnica anterior que utiliza um analisador de glicose Yellow Springs Instrument Model 23A fabricado pela Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, Ohio (YSI). Dividiram-se os dadores em homens e mulheres e ordenaram-se a partir de 35 a 55% em hematocrito. Utilizaram-se as amostras de sangue dentro das 30 horas de recolha, com heparina de lítio como anti-coagulante. Dividiu-se cada amostra em aliquotas e reforçou-se com glucose para proporcionar 152 amostras na variação de 0-700 mg/dl de glicose. Testou-se cada amostra em duplicado num total de 304 pontos de dados. Elaboraram-se as curvas de resposta pela equação apropriada (veja-se as tabelas 1 e 2). Registaram-se então os valores de glicose do MPX vs. Os valores do YSI para proporcionar diagramas de varimento, como se pode observar nas Figuras 6a e 6b para o sis

tema de comprimento de onda simples, e 7a até 7d para o sistema de comprimento de onda dual.

Comparação dos sistemas de MPX: Para os dois períodos de medição de 20 segundos e 30 segundos há visualmente mais dispersão nos diagramas de varrimento de comprimento de onda simples do que nos diagramas de varrimento do comprimento de onda dual. A leitura de 20 segundos torna-se mais dispersa acima dos 250 mg/dl mas a medição de 30 segundos não apresenta ampla dispersão até que o nível de glicose seja superior a 500 mg/dl.

Estes diagramas de varrimento foram quantificados por determinação dos desvios do YSI em várias variações de glicose.. Obtiveram-se os resultados a seguir indicados.

TABELA 6

Exactidão do sistema MPX a partir de dados da recuperação

Medição do MPX Comprimento de onda	Período (seg.)	M.D.P. (mg/dl)	C.V. para variações **(%)		
			0-50	50-250	250-450
Simples	20	±5,6	7,2	14,5	-
Simples	30	±6,9	7,1	8,8	10,2
Dual	20	±2,3	5,3	12,8	-
Dual	30	±2,19	5,5	8,4	

* = Desvio padrão

** = Estas são covariações inter-métodos

Note-se que:

- a. O sistema de comprimento de onda dual apresenta resultados que variaram 30% abaixo do sistema de comprimento de onda simples.
- b. O sistema de comprimento de onda simples, a partir de 0-50

mg/dl, apresentou um desvio padrão de $\pm 6-7$ mg/dl enquanto que o desvio padrão para uma medição de comprimento de onda dual foi apenas de $\pm 2,2$ mg/dl.

- c. A separação para uma medição de MPX de 30 segundos é de 250 mg/dl. Para a variação 50-250 mg/dl as duas medições de 20 e 30 segundos apresentam covariações inter-métodos semelhantes (aproximadamente 7% para comprimento de onda simples, 5,5% para comprimento de onda dual). Contudo, nos limites de 250-450 mg/dl as covariações inter-métodos mais do que duplicam para a leitura de 20 segundos para 14,5% para o comprimento de onda simples e 12,8% para o comprimento de onda dual
- d. A leitura de 30 segundos foi inutilizável acima de 450 mg/dl para as duas medições de comprimento de onda simples e dual (covariações de 10,2% e 8,4%).

Em conclusão, os dois sistemas de MPX apresentam óptima quantificação nos limites de 0-450 mg/dl.

- 1. Sistema MPX - Comprimento de onda dual de 30 segundos: Este sistema de comprimento de onda dual proporciona um período de medição de 30 segundos com um limite de confiança de 95% (definido como a probabilidade de uma medição que se encontra em ± 2 de Desvio Padrão da leitura do YSI) de uma covariação de 11,3% para 50-450 mg/dl (Tabela 7) e $\pm 4,4$ mg/dl (Desvio padrão para 0-50 mg/dl).
- 2. Sistema MPX - Comprimento de onda dual de 30/20 segundos: Este sistema de comprimento de onda dual proporciona um período de medição de 20 segundos nos limites de 0-250 mg/dl e um período de 30 segundos para os limites de 250-450. Os limites de confiança de 95% são quase idênticos ao sistema MPX de comprimento de onda dual de 30 segundos (Tabela 7), 11,1% de covariação para 50-450 mg/dl e $\pm 4,6$ mg/dl (Desvio Padrão) para 0-50 mg/dl.

TABELA 7

Comparação de limites de confiança de 95% para o sistema MPX,
Tiras de reagente de GlucoScan Plus e Accu-Chek bG^{xxxxx}

Variação da medição mg/dl	Comprimento de onda <u>simples de MPX</u>		Comprimento de onda dual <u>de MPX</u>	
	<u>20 seg.</u>	<u>30 seg.</u>	<u>20 seg.</u>	<u>30 seg.</u>
0-50	11,2 mg/dl	13,8 mg/dl	4,6 mg/dl	4,4 mg/dl
50-250	14,4	14,2	10,6	11,0
250-450	-	17,6	-	11,6
77-405	= GlucoScan Plus (Drexler Clinical)			15,9%
77-405	= Accu-Chek bG (Drexler Clinical)			10,7%
50-450	= Híbrida dual de 20/30 seg. em Sistema MPX		11,1%	
50-450	= Comprimento de onda Dual de 30 seg. em Sistema MPX			11,3%

^{xxxxx}Os limites de confiança para MPX encontraram-se a partir de YSI. Os limites de confiança para o GlucoScan Plus e Accu-Chek bG encontraram-se a partir da equação de regressão vs. YSI que elimina a inclinação devida a pequenas diferenças na calibragem

EXEMPLO III

Estabilidade:

A maior parte do trabalho de graduação de níveis desenvolvido na optimização da estabilidade foi complementado com a utilização de discos de membrana PosidyneTM de 0,8 μ humedecidos manualmente. Estabeleceu-se previamente a formulação corante/enzima específica.

1. Estabilidade à Temperatura Ambiente: Este estudo tentou demonstrar graficamente qualquer alteração na resposta do reagente da membrana de Posidyne de 0,8 μ armazenada a 18°C-
-20°C sobre dissecante de gel de sílica. Após 2,5 meses

nao se verificou alteracao notoria conforme se mediu pela resposta de uma amostra a temperatura ambiente vs. a resposta de uma amostra armazenada a 5°C. Cada medicao representava uma variação de glicose de 0-450 mg/dl.

2. Estabilidade a 37°C: Desenvolveu-se um estudo da estabilidade utilizando o mesmo reagente do estudo a temperatura ambiente. As diferenças dos valores de glicose do reagente tratado a 37°C vs. reagente a temperatura ambiente, para tiras tratadas com ou sem adesivo, foram graficamente representadas terminado o tempo. Embora os dados fossem ruidosos devido a fraca reproduutibilidade das tiras manuais, a estabilidade foi excelente para tiras quer fossem tratadas com ou sem adesivo.
3. Estabilidade a 56°C: Desenvolveram-se 8 estudos de estabilidade de 5 a 6 dias utilizando preparações diferentes de uma formulação semelhante sobre uma membrana de disco (Tabela 8). Para o nível de teste de glicose baixo (80-100 mg/dl) o valor de glicose médio desceu sobre pressão em 3,4% sendo a descida mais elevada de 9,55%. Para o nível de teste elevado (280-320 mg/dl) a leitura de glicose diminuiu em média 3,4%, sendo a diminuição mais elevada de 10,0%.

TABELA 8

Estabilidade de pH = 4,0, Reagente de disco de Posidyne de 0,8 μ
Formulação tratada durante 5 dias a 6 dias a 56°C

<u>Amostra No</u>	<u>% da diferença (56°C vs. Amostra à Temperatura Ambiente)</u>	
	<u>YSI (80-100 mg/dl)</u>	<u>YSI (280-320 mg/dl)</u>
FJ22B	-6,25	+5,4
FJ27A	-4,0	-5,14
FJ28B	-2,4	-5,3
FJ30H	-9,55	-10,0
FJ31C	+4,43	-1,24
FJ36	-3,2	-8,5

FJ48B*	-3,0	0,0
GM48A*	<u>-3,0</u>	<u>-2,5</u>
Média de 8	-3,4	-3,4

*Estas duas amostras contêm duas vezes a concentração normal de enzima e corante.

Um estudo do tratamento desta membrana a 56°C, passado um período de 19 dias, não apresentou diferenças significativas para tiras tratadas com ou sem adesivo. Nos dois casos a diminuição em 19 dias no valor da glicose foi inferior a 15% em níveis de teste baixo (80-100 mg/dl) e também a 300 mg/dl.

Concluiu-se um outro estudo a 56°C utilizando uma membrana de PosidyneTM de 0,8 μ com o dobro da concentração normal de enzima e corante. Efectuaram-se duas preparações separadas da mesma formulação e mediu-se a estabilidade após um período de 14 dias. Compararam-se a média dos resultados dos dois estudos. Encontraram-se alterações entre $\pm 0\%$ após o período de 14 dias nos dois níveis de teste de glicose alto e baixo.

EXEMPLO IV

Dimensão da Amostra

As características de dimensão da amostra para o sistema MPX estão representados na Tabela 9

TABELA 9

Efeito da Dimensão da Amostra nas Medidas do Sistema MPX

<u>Dimensão da Amostra (ul)</u>	<u>Comprimento de onda dual</u>	<u>Comprimento de onda simples</u>
3	41 50 39 31	40 31 42 30 19 30

TABELA 9 (continuação)

4	44	49	49	49	48	41	45	44	45	45	44
5	54	48	49	51	50	50	49	48	49	49	49
10	48	48	50	47	48	54	53	56	55	55	54
20	49	49	49	50	49	55	57	58	60	58	

YSI = 360

3	301	260	276	286	280	274	232	244	260	252	
4	383	378	367	341	367	361	356	342	318	344	
5	398	402	382	370	388	378	387	366	351	370	
10	364	362	378	368	368	356	358	379	369	366	
20	375	370	380	378	376	380	382	389	385	384	

Os volumes referidos na Tabela foram transferidos para a almofada de reagente 10 representa na Figura 1, utilizando uma micropipeta. Quando se aplica sangue de uma picada no dedo para uma tira, a totalidade da amostra não pode ser transferida. Assim, os volumes listados aqui não representam a dimensão da totalidade da amostra necessária a ser espremida de um dedo para análise. Uma amostra de 3 μ l é o mínimo necessário para cobrir por completo o círculo da almofada de reagente. Isto não proporciona amostra suficiente para saturar por completo a almofada de reagente e o sistema MPX, quer a comprimentos de onda simples ou dual, apresenta fracos resultados. Uma amostra de 4 μ l mal satura a almofada de reagente, enquanto uma amostra de 5 μ l é claramente apropriada. Uma amostra de 10 μ l é uma grande gota brilhante e uma amostra de 20 μ l é uma gota muito grande e é só provavelmente utilizada quando o sangue de uma pipeta se utiliza para constituir amostras.

Na concentração de glicose mais baixa o resultado do comprimento de onda simples apresenta alguma dependência da dimensão da amostra, que é completamente eliminada utilizando a medição de comprimento de onda dual. Embora esta dependência com o comprimento de onda simples possa ser considerada

rada aceitável, é claramente indesejável.

EXEMPLO V

Reprodutibilidade:

Efectuaram-se sempre com repetição as medições experimentais descritas anteriormente, normalmente 2, 3 ou 4 determinações por ponto de dados. Estes conjuntos apresentaram sempre íntima concordância mesmo em amostras com níveis extremos de oxigénio e hematócritos. As covariações apresentaram-se bem abaixo dos 5%. Parece assim que a reprodutibilidade é muito boa a excelente.

A matéria da presente invenção é produzida por muitos comercialmente ou tem sido descrita na literatura. Os protocolos são simples e requerem pouca especialidade técnica e estão relativamente livres de erro do operador. Os testes podem ser efectuados rapidamente. Utilizam reagentes não dispendiosos e relativamente inofensivos, considerações importantes para os materiais utilizados em casa. O utilizador obtém resultados que podem ser interpretados e utilizados em conjunto com uma terapia de manutenção. Além disto, os reagentes apresentam longa durabilidade, pelo que os resultados obtidos serão de confiança durante longos períodos de tempo. O equipamento é simples e seguro e substancialmente automático.

Todas as patentes e outras publicações especificamente identificadas com esta descrição são indicadoras do nível de especialidade dos peritos comuns da técnica em que a presente invenção se inclui e se encontram aqui individualmente incorporados por referência ao mesmo âmbito, como aconteceria se cada referência fosse específica e individualmente incorporada por referência.

Estando agora a presente invenção descrita na

totalidade, será aparente para um perito da técnica comum que se podem fazer muitas modificações e alterações sem partir do espírito e do âmbito da presente invenção conforme se definiram nas reivindicações que se seguem.

REIVINDICAÇÕES

- 1a -

Processo para posicionar uma fita reagente possuindo um entalhe numa das suas extremidades e uma perfuração centralizada, com um equipamento de leitura de reflectância que possui uma haste adjacente a um dispositivo de leitura óptica, caracterizado por:

se ajustar o referido entalhe da fita reagente contra a referida haste do dispositivo de leitura de reflectância, de modo que o referido entalhe possa rodar em torno da haste de modo a fazer com que a perfuração centralizada seja colocada sobre o referido dispositivo de leitura óptica.

- 2a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o dispositivo de leitura de reflectância possuir um canal em cascata com o referido entalhe, estando a haste localizada no interior desse canal e englobando ainda a fita reagente uma lâmina rectangular fina e estreita com uma largura idêntica à do referido canal e possuindo duas extremi-

dades, estando o referido entalhe localizado na primeira das referidas extremidades, e por adicionalmente se colocar a referida lámina rectangular no canal referido após ajustamento do entalhe à referida haste, de modo que a colocação no referido canal proporciona o ajustamento do dispositivo de leitura óptico sob a perfuração centralizada colocada no referido canal.

- 3a -

Processo para alinhar uma fita reagente possuindo um entalhe numa das suas extremidades e uma perfuração centralizada com um dispositivo de leitura de reflectância possuindo um dispositivo de leitura óptica por baixo de um canal que possui aproximadamente a mesma largura da referida fita reagente, possuindo ainda esse canal uma haste numa das suas extremidades, caracterizado por se colocar a fita no referido canal e por permitir o ajustamento do referido entalhe à haste, rodando depois a referida fita em torno da haste de modo que a perfuração centralizada fique colocada sobre o referido dispositivo de leitura óptica, ficando a fita reagente bem colocada no referido canal.

- 4a -

Processo para cronometrar uma medição num dispositivo de leitura de reflectância, caracterizado por:

se fazer pelo menos uma primeira leitura de reflectância óptica a partir de uma primeira superfície de uma matriz porosa numa fita reagente, antes da aplicação de uma amostra à segunda superfície da referida matriz;

se fazer pelo menos uma leitura de reflectância adicional a partir da referida primeira superfície; e

- 46 -

se comparar a referida leitura de reflectância adicional com a primeira leitura de reflectância e se iniciar a medição do tempo após uma queda pré-determinada na reflectância resultante do facto de a referida amostra atingir a referida primeira superfície.

- 5a -

Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por se fazer pelo menos uma medição da leitura de reflectância num momento pré-determinado depois de a referida leitura adicional de reflectância diferir do referido valor de reflectância pelo valor da diferença pré-determinada.

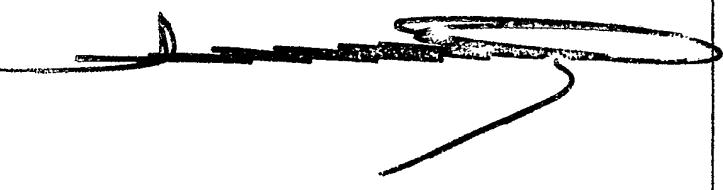
- 6a -

Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por a referida superfície se encontrar inicialmente seca e por a referida leitura de reflectância adicional diferir do referido primeiro valor de reflectância quando um meio de ensaio líquido constituído por uma tinta misturada com o sangue penetra na referida primeira superfície da referida matriz.

- 7a -

Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por a referida tinta precursora ser uma combinação de glicose oxidase, peroxidase e de um corante MBTH-DMAB (cloridrato de 3-metil-2-benzo-tiazolinona hidrazona e ácido 3-dimetil-amino-benzoíco).

- 47 -


- 8a -

Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o referido tempo pré-determinado ser pelo menos 20 segundos.

- 9a -

Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o referido tempo pré-determinado ser de pelo menos 30 segundos.

- 10a -

Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o referido tempo pré-determinado ser no máximo de 30 segundos.

- 11a -

Processo para normalizar a comutação de reflectância num sistema que possui um leitor óptico susceptível de ler a reflectância da luz emitida por uma diversidade de diodos emissores de luz (LED), sendo essa luz reflectida para o referido leitor óptico a partir de uma membrana porosa, caracterizado por:

se explorar a referida membrana porosa à procura de uma leitura de reflectância da intensidade dos referidos LEDS antes de se colocar uma amostra de ensaio;

se introduzir a referida leitura nos meios de controlo, sendo esses meios de controlo susceptíveis de arma-

zenar leituras da intensidade dos referidos LEDS, sendo os referidos meios de controlo capazes ainda de igualar a diferença entre um par de leituras do LED inicial e subsequente; e se utilizarem os referidos meios de controlo para activar a potânciia que permite ajustar a intensidade dos LEDS para proporcionar a mesma leitura de reflectânciia para cada LED.

- 12a -

Processo para a determinaçao dos níveis de glicose no sangue caracterizado por:

se colocar uma gota de sangue numa fita reagente;

se colocar a referida fita num aparelho de medida por exploraçao da reflectânciia em que o referido aparelho de medida é sensivel à presençia da amostra de sangue na referida fita reagente, iniciando o aparelho de medida por exploraçao da reflectânciia uma sequênciia temporal depois de detectar a presençia da referida amostra de sangue na fita reagente;

se fazerem medições de reflectânciia: (1) a partir da luminosidade própria do referido aparelho de medida (R_b); (2) antes de a referida fita reagente conter sangue (R_{seco}); e (3) num momento pré-determinado (R_t), e calculando depois R^*t em que

$$R^*t = (R_t - R_b) / (R_{seco} - R_b) ;$$

utilizando R^*t para calcular $K/S-t$, em que se define $K/S-t$ como

$$(1 - R^*t)^2 / (2 \times R^*t) ; e$$

se calcularem os níveis de glicose a partir do referido valor $K/S-t$.

- 13a -

Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por o tempo pré-determinado ser de 20 segundos e por se definir o nível de glicose do modo seguinte: $-55,75 + 0.1632 \times (K/S-t) - (5.765 \times 10^{-5}) \times (K/S-t)^2 + (2.58 \times 10^{-8}) \times (K/S-t)^3$.

- 14a -

Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por o tempo pré-determinado ser de 30 segundos e o nível de glicose ser definido do modo seguinte: $-55,25 + 0.1334 \times (K/S-t) - (2.241 \times 10^{-5}) \times (K/S-t)^2 + (1.20 \times 10^{-8}) \times (K/S-t)^3$.

- 15a -

Processo para a determinação de níveis de glicose no sangue caracterizado por:

se colocar uma gota de sangue numa fita reagente;

se colocar a referida fita num aparelho de medida por exploração da reflectância, sendo o referido aparelho de medida sensível à presença da amostra de sangue na referida fita reagente, iniciando o aparelho de medida por exploração de reflectância uma sequência temporal depois de detectar a presença da referida amostra de sangue na fita reagente;

se fazerem medições de reflectância: (1) a partir da luminosidade própria do referido aparelho de medida (R_b); (2) antes da referida fita reagente conter sangue (R_{seco}); (3) decorridos 15 segundos após a fita reagente conter sangue (R_{15}); e (4) num momento final pré-determinado (R_t); se utilizarem as referidas leituras para cal-

cular R^{*15} e R^{*t} de acordo com as propriedades seguintes:

$$R^{*15} = (R_{15} - R_b) / (R_{seco} - R_b)$$

$$R^{*t} = (R_t - R_b) / (R_{seco} - R_b) ;$$

se calcularem os níveis K/S_{15} e K/S_t , sendo os referidos níveis definidos do modo seguinte:

$$K/S_{15} = (1 - R^{*15})^2 / (2 \times R^{*15})$$

$$K/S_t = (1 - R^{*t})^2 / (2 \times R^{*t}) ;$$

se normalizar o referido valor K/S_{15} para se chegar a um valor K/S_{15n} definido por

$$K/S_{15n} = (1,54 \times K/S_{15}) - 0,1333 ;$$

se chegar a um valor K/S_{t15} definido por

$$K/S_{t/15} = K/S_t - K/S_{15n} ; \text{ e}$$

se utilizar o referido valor $K/S_{t/15}$ para calcular os referidos níveis de glicose.

- 16a -

Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por o tempo pré-determinado ser de 20 segundos e por se definir o referido nível de glicose do modo seguinte:

$$\begin{aligned} & -0,01388 + 0,1064 \times (K/S_{t/15}) + (6,259 \times 10^{-5}) \times \\ & \times (K/S_{t/15})^2 - (6,12 \times 10^{-8}) \times (K/S_{t/15})^3 + \\ & + (3,21 \times 10^{-11}) \times (K/S_{t/15})^4. \end{aligned}$$

- 17a -

Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por o referido tempo pré-determinado ser de 30 segundos e se definir o referido nível de glicose (YSI) do modo

seguinte: $1,099 + 0,05235 \times (K/S_{t/15}) + (1,229 \times 10^{-4}) \times (K/S_{t/15})^2 - (5,83 \times 10^{-8}) \times (K/S_{t/15})^3 + (1,30 \times 10^{-11}) \times (K/S_{t/15})^4$.

- 18a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado por a referida fita reagente ser constituída por uma matriz porosa;

um sistema gerador de sinal na referida matriz porosa para reacção com a amostra de sangue completo; e

uma aba ligada à referida matriz porosa para manusear a referida fita reagente após a colocação da amostra de sangue na matriz porosa.

- 19a -

Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por a referida matriz porosa ser constituída por uma membrana hidrofílica a qual contém aberturas com dimensões entre 0,6 micra e 1,0 micron.

- 20a -

Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por o referido sistema gerador de sinal ser constituído por glicose oxidase, peroxidase e um indicador corante

- 21a -

Processo de acordo com a reivindicação 20, caracterizado por o referido indicador corante ser um indicador MBTH-DMAB (cloridrato de 3-metil-2-benzo-tiazolinona hidrazona e ácido 3-dimetil-amino-benzóico).

- 22a -

Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado por a referida matriz porosa ser mantida de forma estável com um valor de pH inferior a 4,8 e numa solução citrato a 10% aproximadamente.

- 23a -

Processo de acordo com a reivindicação 22, caracterizado por a referida matriz porosa ser mantida de uma forma estável para valores de pH próximos de 4,0.

- 24a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores para a medição de glicose numa amostra de sangue completo em que a referida fita reagente está adaptada para colocação no equipamento de leitura de reflectância, caracterizado por a referida fita ser constituída por:

uma membrana hidrofílica porosa possuindo poros com dimensões entre 0,6 micra e 1,0 micron aproximadamente

um sistema gerador de sinal de glicose oxida-se, peroxidase e um indicador corante incorporado na referida membrana para reacção com a amostra de sangue completo; e

uma aba ligada à referida matriz porosa para

manusear a referida fita reagente depois da colocação da amostra de sangue na matriz porosa.

- 25a -

Processo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por se manter a fita reagente com um valor de pH inferior a 4,8 e numa solução de citrato a 10% aproximadamente.

- 26a -

Processo de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por o valor do pH ser cerca de 4,0.

- 27a -

Processo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por o referido indicador corante ser um indicador MBTH-DMAB.

- 28a -

Processo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por se manter a membrana hidrofílica numa solução de poliamida com uma carga positiva e por conter pelo menos dois lados lisos, estando o primeiro dos referidos lados ligado à referida aba, sendo possível colocar a amostra do sangue no referido primeiro lado de modo que a amostra migre para o segundo dos referidos lados.

- 29a -

Processo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado por a referida aba ser constituída por uma lâmina rectangular que possui duas extremidades, contando a lâmina rectangular uma perfuração centralizada para ligação à referida membrana porosa, e possuindo a referida lâmina rectangular um entalhe cortado numa das referidas extremidades.

- 30a -

Processo de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por o referido entalhe ser susceptível de ajustamento a uma haste sobre o dispositivo de leitura de reflectância para garantir um alinhamento repetitivo da referida membrana sobre um leitor de reflectância.

- 31a -

Processo de acordo com a reivindicação 29, caracterizado por a referida membrana hidrofílica conter dois lados lisos, estando o primeiro dos referidos lados lisos da membrana ligado à referida aba na perfuração centralizada, e sendo possível inserir a amostra de sangue no primeiro lado da membrana através da referida perfuração de modo que a amostra migre para o segundo lado da membrana lisa.

- 32a -

Processo de acordo com a reivindicação 31, ca



racterizado por a referida fita reagente estar preparada para leitura pelo aparelho de medição de reflectância após saturação do referido segundo lado da membrana lisa.

- 33a -

Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por o referido segundo lado da membrana lisa possuir uma área compreendida aproximadamente entre 10 mm² e 50 mm².

- 34a -

Processo de acordo com a reivindicação 33, caracterizado por o referido segundo lado da membrana lisa possuir um diâmetro compreendido aproximadamente entre 2 mm e 10 mm.

- 35a -

Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por o referido segundo lado da membrana se encontrar preparado para leitura pelo equipamento de medição de reflectância depois da colocação de um volume compreendido aproximadamente entre 5 microlitros e 10 microlitros de amostra de sangue sobre a referida membrana hidrofilica.

- 36a -

Processo de acordo com a reivindicação 32, ca

racterizado por o referido segundo lado da membrana se encontrar preparado para leitura pelo referido segundo lado da membrana lisa sem separação da amostra de sangue nas suas partes componentes.

- 37^a -

Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado por o referido segundo lado da membrana se encontrar preparado para leitura após colocação de um volume limiar da referida amostra de sangue sobre a membrana hidrofílica, sendo a fita reagente susceptível de ler a amostra de sangue apesar do volume dessa amostra na fita reagente ficar acima do referido volume limiar.

- 38^a -

Processo de acordo com a reivindicação 37, caracterizado por o referido volume limiar estar compreendido entre 5 microlitros e 10 microlitros da referida amostra de sangue completo.

- 39^a -

Processo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores para a medição de glicose numa amostra de sangue completo, estando a fita reagente adaptada para colocação num equipamento de leitura de reflectância, caracterizado por a referida fita ser constituída por:

uma aba adaptada para colocação no referido equipamento de leitura de reflectância, englobando a referida aba uma fina lámina rectangular possuindo duas extremidades

de cada lado de uma perfuração centralizada com um diâmetro compreendido aproximadamente entre 2 mm e 10 mm, em que uma das referidas extremidades possui um entalhe que se prolonga sensivelmente até ao meio a partir da referida extremidade;

por uma membrana hidrofílica porosa que possui dois lados lisos estando um primeiro dos referidos lados ligados à aba na perfuração centralizada, contendo a referida membrana poros que possuem abertura com dimensões compreendidas entre 0,6 micra e 1,0 micron; e

por uma solução corante incorporada na referida membrana porosa incluindo glicose oxidase, peroxidase e um indicador MBTH-DMAB mantendo-se a referida solução corante na membrana hidrofílica com valor de pH próximos de 4,8 e numa solução de citrato de 10%,

sendo a referida fita reagente susceptível de medir amostras de sangue completo sem que haja separação da referida amostra nos seus componentes depois de se ter colocado um volume limiar de amostra de sangue na referida membrana hidrofílica.

- 40a -

Processo de acordo com a reivindicação 39, caracterizado por a referida amostra de sangue poder ser colocada através da referida perfuração centralizada sobre o referido primeiro lado da membrana hidrofílica e em que a amostra de sangue é susceptível de migrar para o referido segundo lado da membrana hidrofílica, podendo as leituras das medidas de reflectância ser efectuadas pelo equipamento de leitura de reflectância.

- 41a -

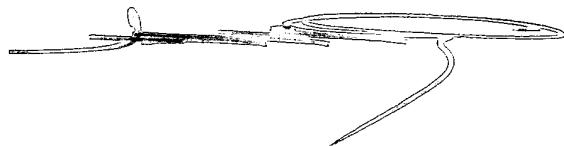
Processo de acordo com a reivindicação 40, ca

racterizado por o referido volume limiar estar compreendido aproximadamente entre 5 microlitros e 10 microlitros da referida amostra de sangue completo.

A requerente reivindica a prioridade do pedido norte-americano apresentado em 28 de Abril de 1988, sob o número de série 187,602.

Lisboa, 27 de Abril de 1989.

DR. JOSÉ ALBERTO GOMES DA INDÚSTRIA



R E S U M O

"PROCESSO E DISPOSITIVO PARA A DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE COMPOSTOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS (ANALÍTICOS) EM FLUIDOS AQUOSOS

A presente invenção refere-se a um processo para a determinação da presença de um analito (componentes químicos e bioquímicos em fluidos aquosos) num fluido, em conjunto com diversos componentes de um equipamento especialmente projectado para executar o processo.

O processo implica a realização de uma leitura de reflectância a partir de uma superfície de uma matriz porosa inerte impregnada com um reagente que irá interactuar com o analito (componentes químicos e bioquímicos em fluidos aquosos) para proporcionar um produto de reacção absorvente de luz quando se aplica o fluido que vai ser analizado a outra superfície e migra através da matriz para a superfície que vai ser lida. As medidas de reflectância são feitas em dois comprimentos de onda separados no sentido de eliminar interfeções, accionando-se um circuito de cronometragem através da diminuição inicial da reflectância por humedecimento da superfície cuja reflectância vai ser medida, devido ao fluido que passa através da matriz inerte. Garante-se a possibilidade de repetição através de uma técnica de normalização adaptada à fonte de luz antes de cada leitura, e através de um processo de alinhamento executado sobre a fita reagente antes da colocação no aparelho. O processo e o aparelho são particularmente adequados para a medição de níveis de glicose no sangue sem que seja necessário separar do soro e do plasma as células vermelhas do sangue.

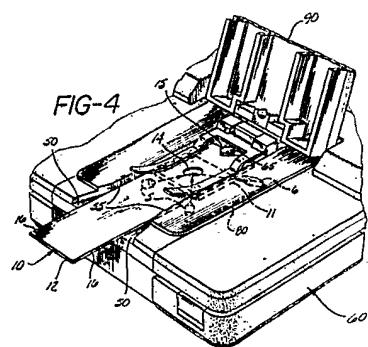
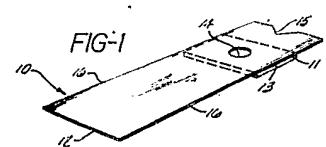


FIG. 1

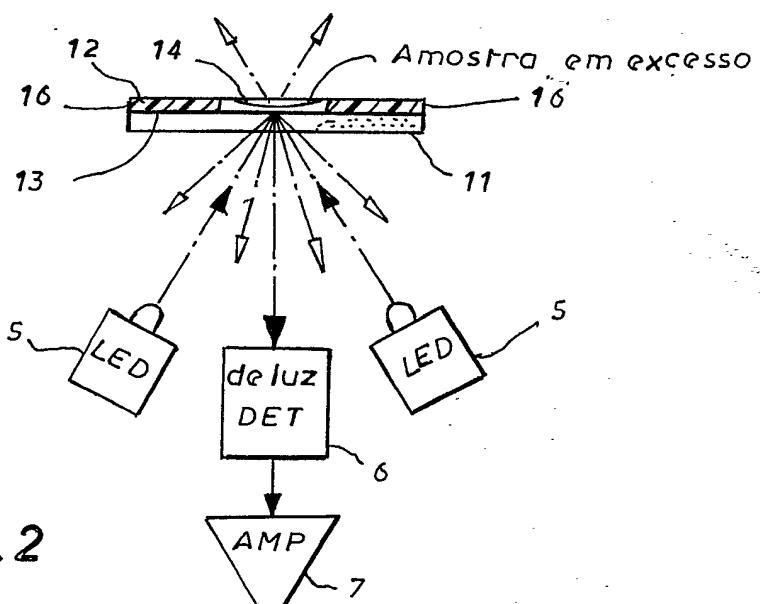
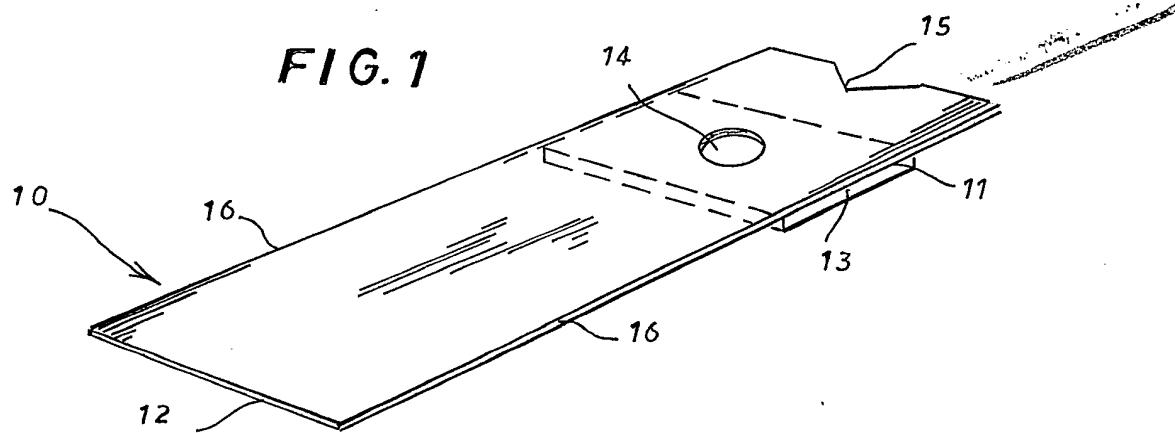


FIG. 2

FIG. 3

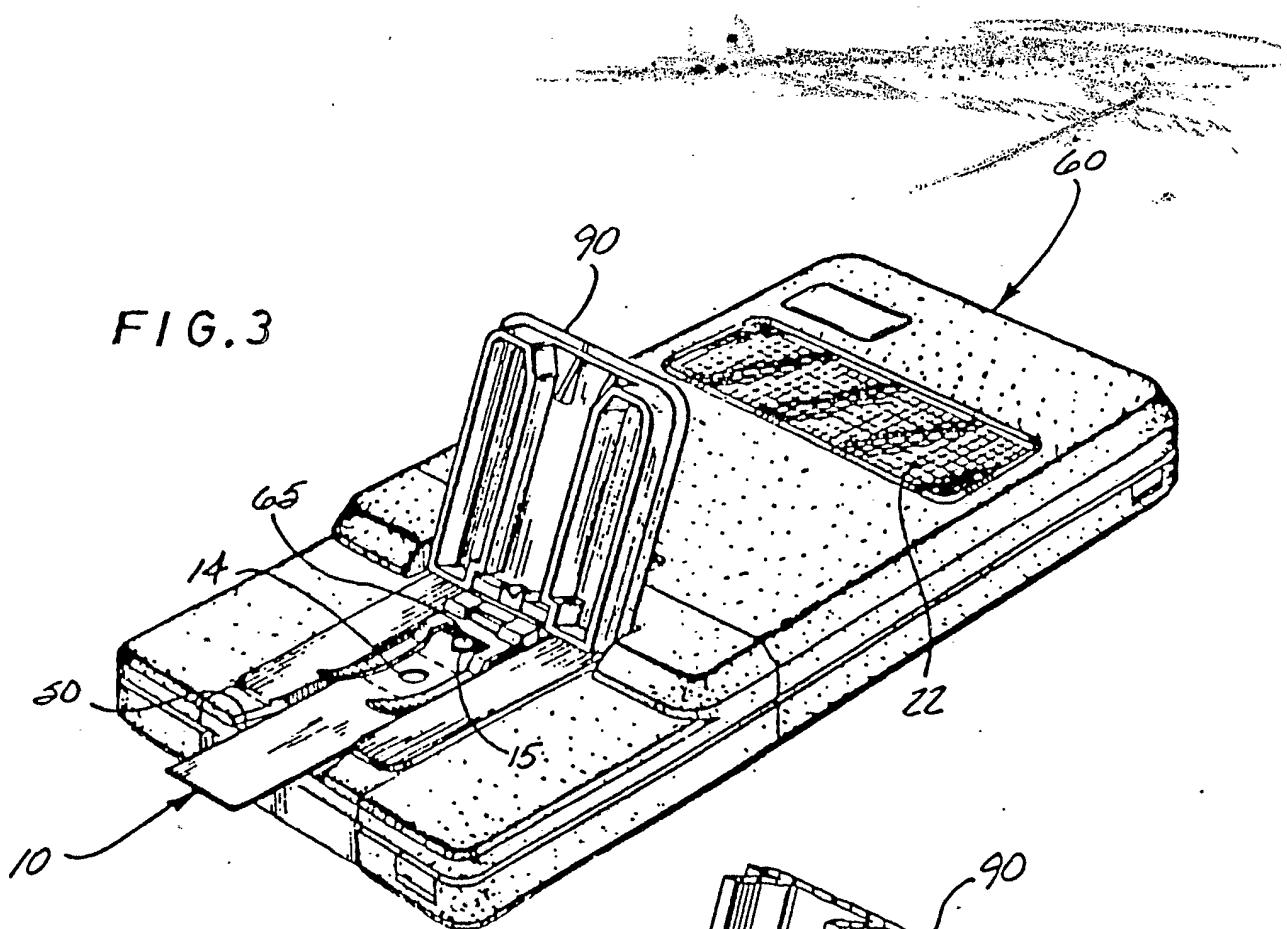


FIG. 4

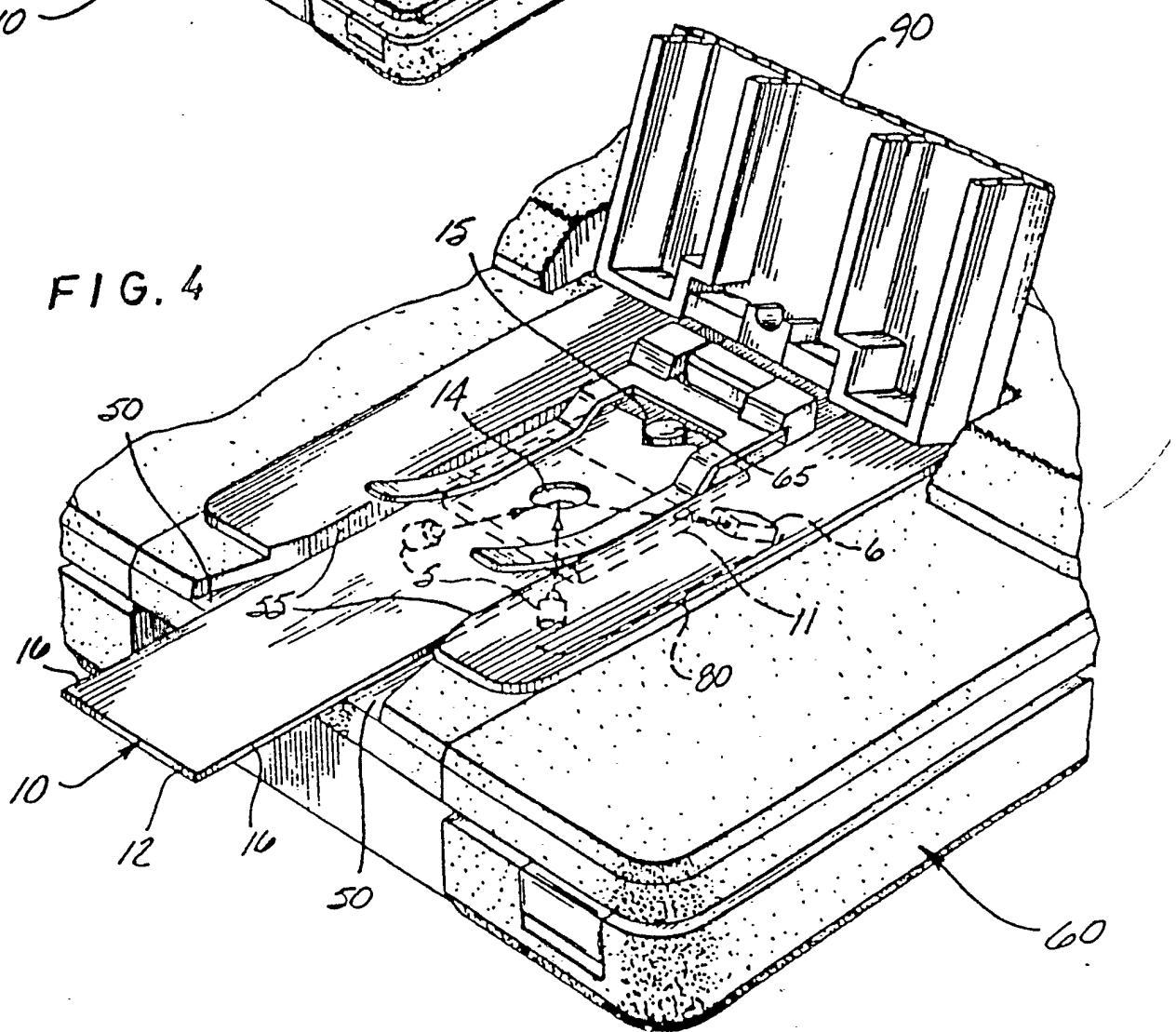


FIG. 5

Processo de correção do comprimento de onda
dual de segunda ordem

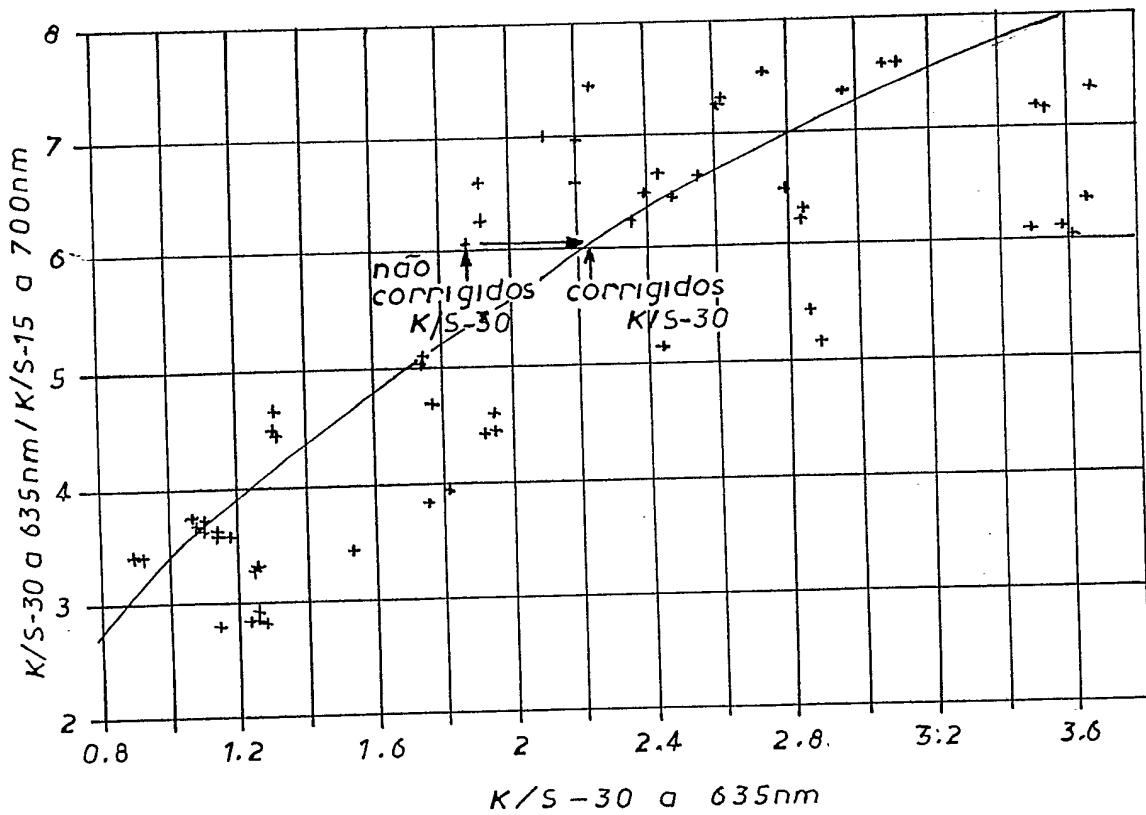


FIG. 6a

Diagrama de varrimento durante 20 segundos
comprimento de onda simples, medição de glicose

Diagrama de varrimento

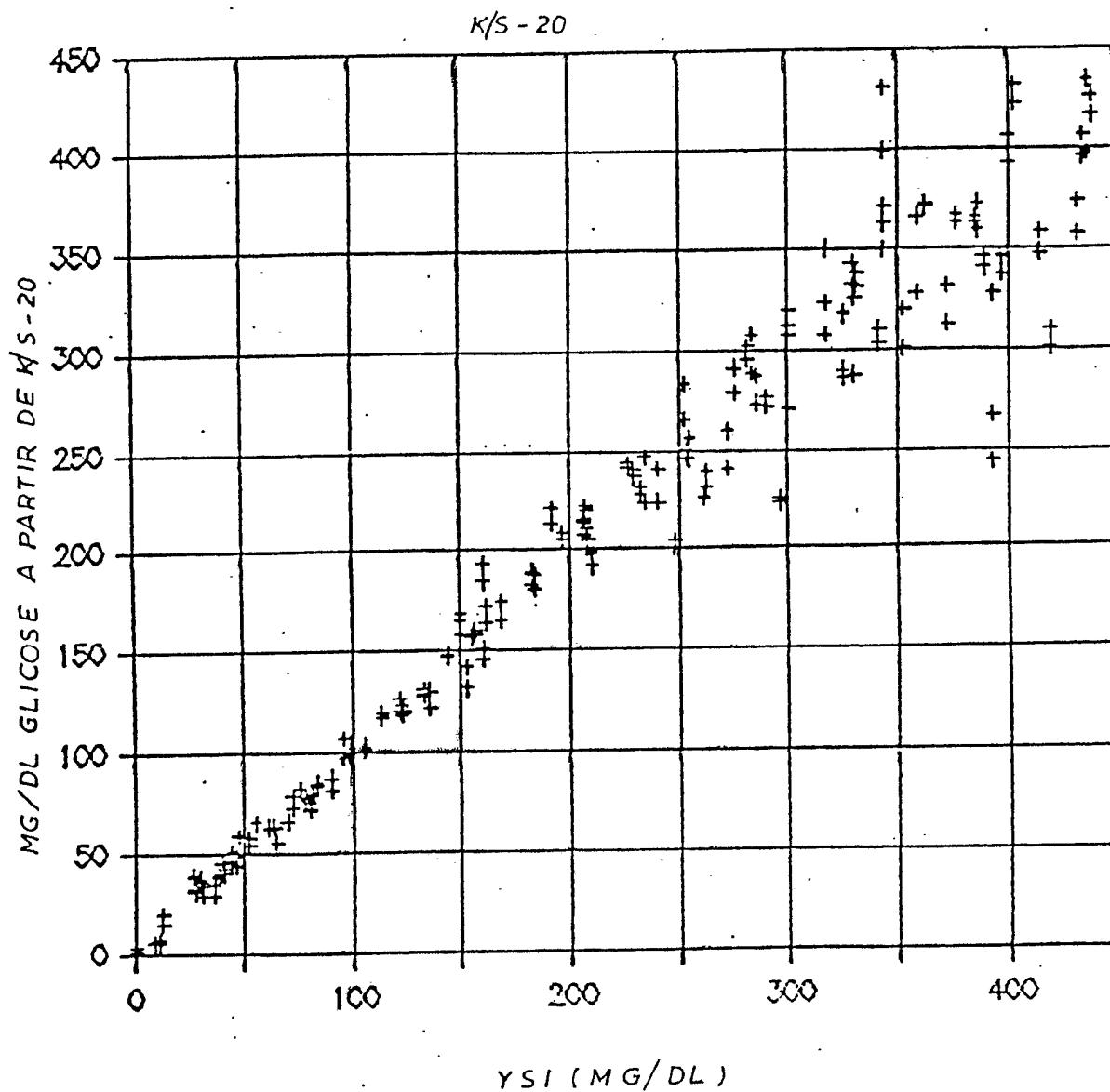


FIG. 6b

Diagrama de varrimento durante 30 segundos
comprimento de onda simples medição de glicose

Diagrama de varrimento

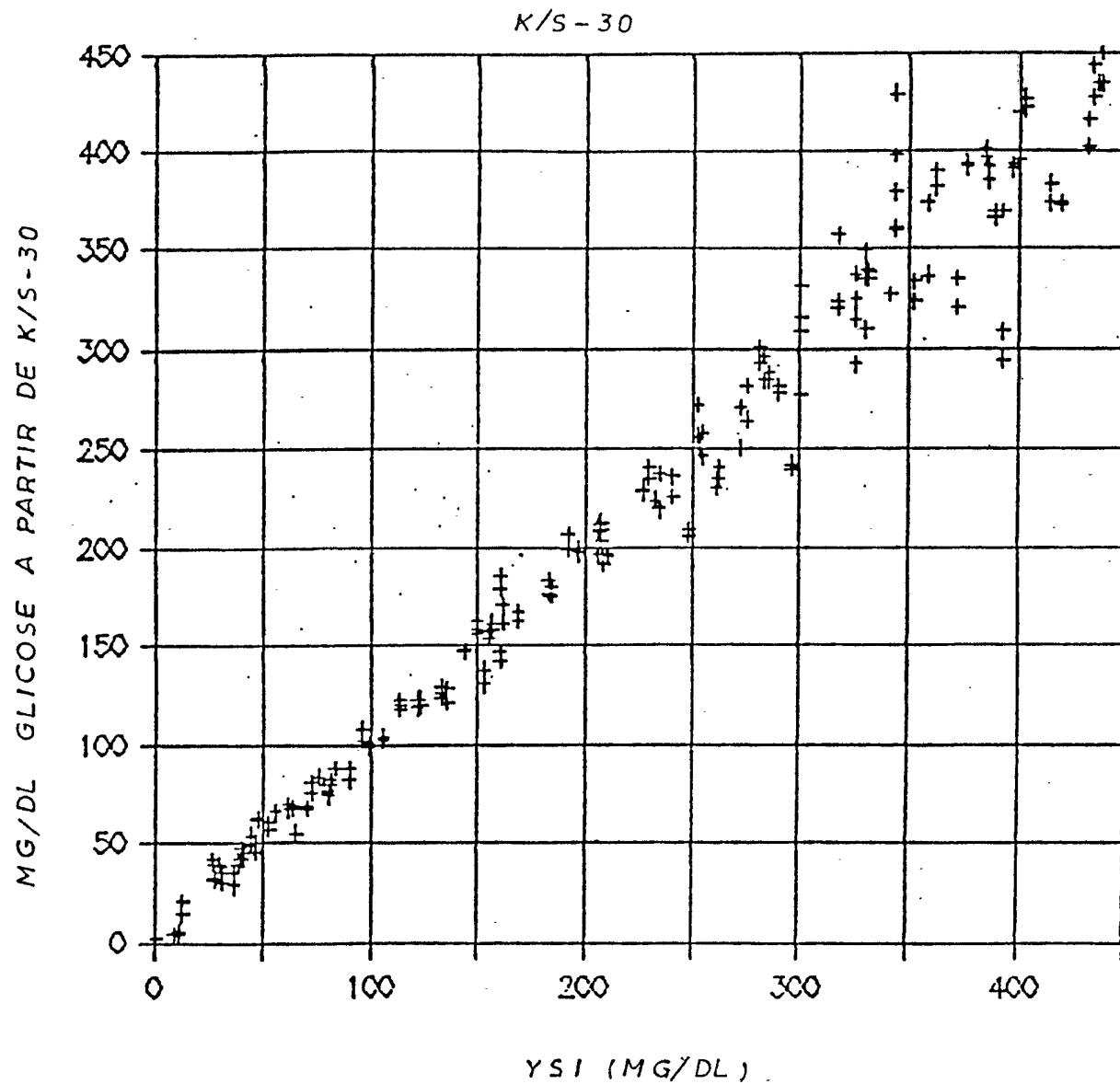


FIG. 7a

Diagrama de varrimento durante 20 segundos
comprimento de onda dual, medição de glicose

Diagrama de varrimento

K/s - 20/15

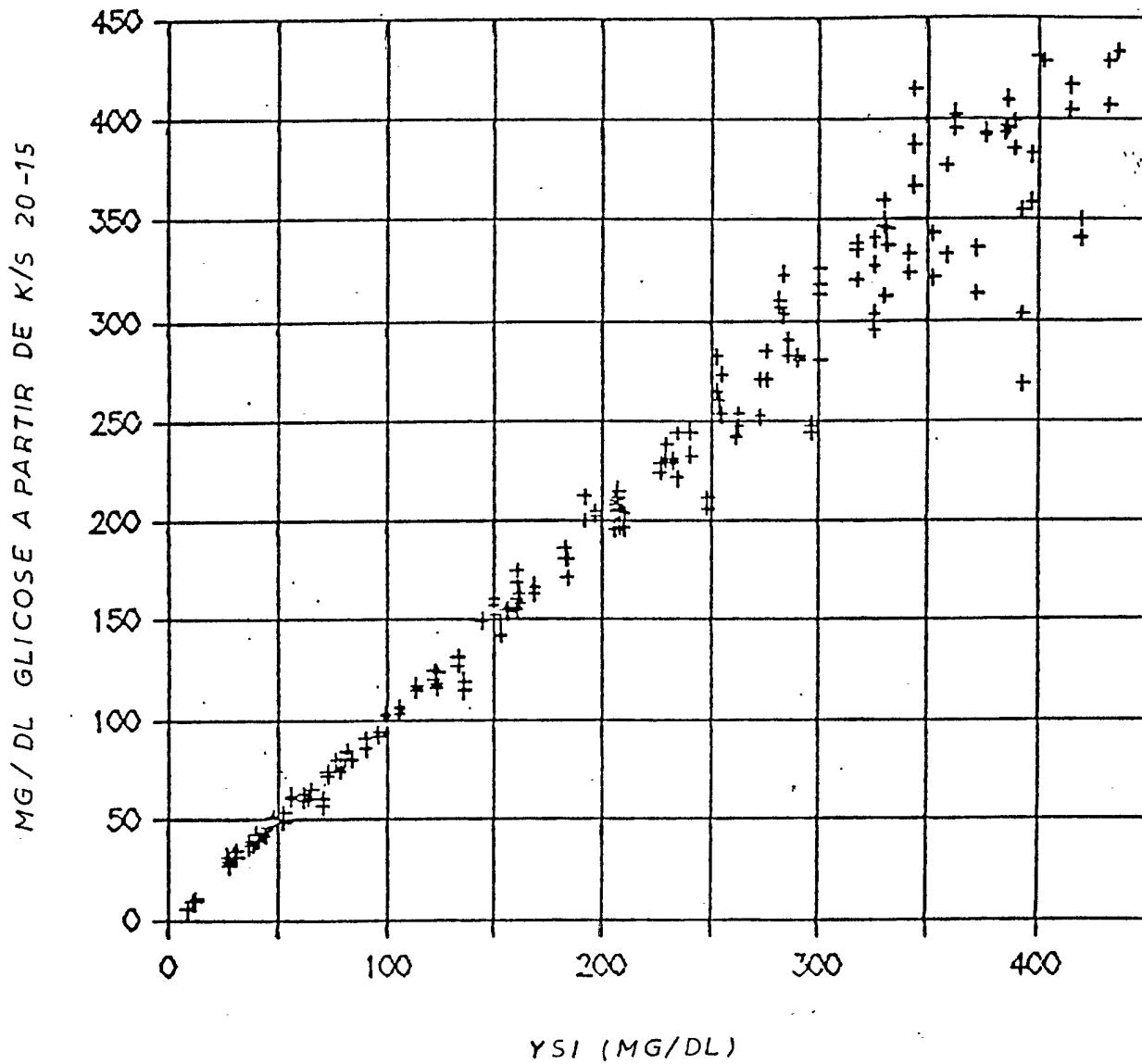


FIG. 7b

Diagrama de varrimento durante 30 segundos, comprimento de onda dual, medição de glicose (intervalo de 0-450 mg dl)

Diagrama de varrimento

K/S - 30/15

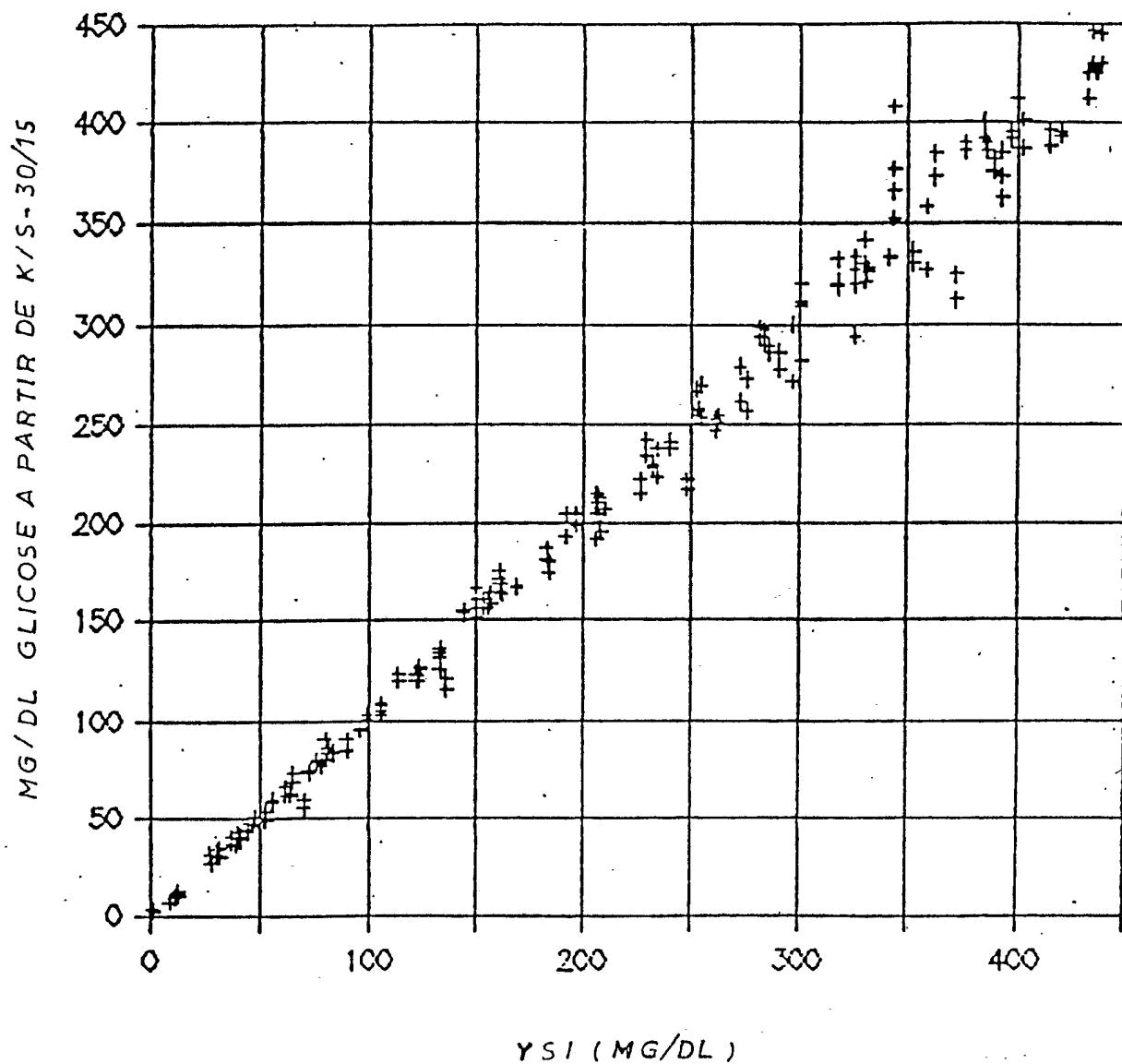


FIG. 7c

Diagrama de varrimento durante 30 segundos, comprimento de onda dual, medição de glicose (intervalo 0-800 mg dl)

Diagrama de varrimento

K/S - 30/15

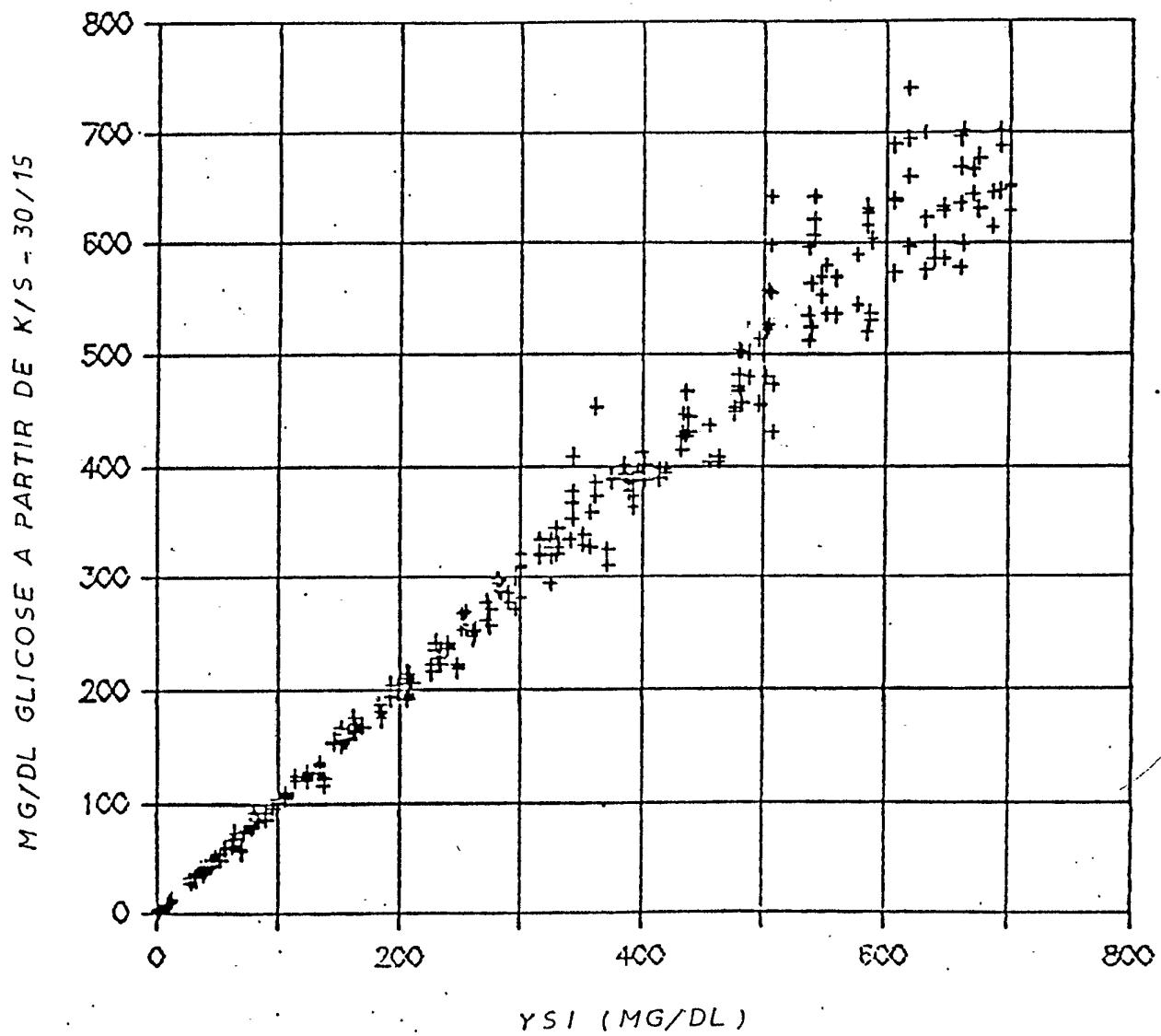


FIG. 7d

Diagrama de varrimento para combinar as medições de glicose em 20 e em 30 segundos
(intervalo para 20 segundos 0-250 mg/dl e
intervalo para 30 segundos 250-450 mg/dl)

Diagrama de varrimento

COMBINAÇÃO DAS LEITURAS DE 20 E DE 30 SEGUNDOS

MG DL GLICOSE A PARTIR DE K/S - 20/15, K/S-30/15

